

Aus dem Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung
der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Volumenregulation von Müllerzellen

Inaugural-Disseration
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae
durch die Medizinische Fakultät der
Universität Leipzig

eingereicht von
Florian Neumann
aus Kassel

Verleihung des akademischen Grades
am 29.01.2013

Biibliographische Zusammenfassung.....	4
1 Einleitung.....	5
2 Literaturübersicht	7
2.1 Die Retina	7
2.2 Die Müllerzelle	7
2.3 Das Hirn- bzw. Netzhautödem	9
2.4 Volumenhomöostase der Retina	10
2.5.1 Schwellungsverhalten von Müllerzellen.....	11
2.5.2 Rezeptor-vermittelte Hemmung des Schwellungsverhaltens von Müllerzellen.....	12
2.6 Sexualsteroid.....	12
2.7 Zielsetzung der Doktorarbeit	14
3 Tiere, Material und Methoden	15
3.1 Versuchstiere.....	15
3.2 Verwendete Lösungen und Substanzen.....	15
3.2.1 Extrazelluläre Lösung (EZL)	15
3.2.2 Hypotone Lösung	16
3.2.4 Vitalfarbstoff	16
3.3 Sexualsteroid.....	16
3.4 Verwendete Testsubstanzen.....	17
3.5 Ischämie Modell.....	18
3.6 Diabetes Modell	19
3.7 Präparation der Netzhaut	19
3.8 Anfertigen von Schnittpräparaten der Retina.....	20
3.9 Versuchsschema und Durchführung	22
3.10 Aufnahmen der Müllerzellsomata mit dem Laser-Scanning-Mikroskop	22
3.11 Ausmessen der Müllerzellquerschnittsfläche.....	23
3.12 Statistische Analyse.....	24
4 Ergebnisse.....	25
4.1 Das Schwellungsverhalten von Müllerzellen unter hypoosmolaren Bedingungen	25
4.2 Beteiligung von Entzündungsmediatoren und oxidativem Stress an der Entstehung von Gliazellschwellung	27
4.3 Wirkung von Geschlechtshormonen auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen	29
4.4 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Geschlechtshormonen	30
4.5 Rezeptor-vermittelte Hemmung des Schwellungsverhaltens von Müllerzellen.....	31
4.6 Einfluß spannungsabhängiger Natrium- und Calcium-Kanäle auf das Schwellungsverhalten Müllerzellen	35
5 Diskussion	37
5.1 Ba ²⁺ -Ionen induzierte Müllerzellschwellung als Pathologiemodell.....	37
5.2 Einfluß von Entzündungsmediatoren und oxidativem Stress auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen	37
5.3 Die Wirkungsweise von Geschlechtshormonen auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen	39
5.4 Die intrinsische Aktivität der Signalkaskade	42
6 Zusammenfassung	43
8 Literaturverzeichnis.....	48

Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1 Testsubstanzen.....	16
Abbildung 1 Präparation der Netzhaut.....	19
Abbildung 2 Schema der Perfusionskammer und Netzhaut.....	20
Abbildung 3 Schwellung unter hypoosmolaren Bedingungen.....	24
Abbildung 4 Postischämische und diabetische Netzhäute.....	25
Abbildung 5 Entzündungsmediatoren und oxidativer Stress.....	27
Abbildung 6 Wirkung von Geschlechtshormonen.....	28
Abbildung 7 Konzentrationsabhängigkeit.....	30
Abbildung 8 Rezeptor-vermittelte Hemmung (Postischämisch).....	31
Abbildung 9 Rezeptor-vermittelte Hemmung.....	32
Abbildung 10 Rezeptor-vermittelte Hemmung (Diabetes).....	33
Abbildung 11 Einfluss von Natrium- und Calcium-Kanälen.....	34
Abbildung 12 Schematische Darstellung der Wirkung von Progesteron.....	39

Biobibliographische Zusammenfassung

Neumann, Florian:

Einfluß von Geschlechtshormonen auf die Volumenregulation von Müllerzellen 2012 – 58
Seiten

Leipzig, Medizinische Fakultät Leipzig, Fachbereich Pathophysiologie der Neuroglia,
Promotion

Referat

Die Promotionsarbeit beschäftigt sich mit dem Verhalten und der Volumenregulation von Müllerzellen in der Retina unter dem Einfluß von Geschlechtshormonen.

Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss von Geschlechtshormonen auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen der Ratte in hypoosmolarem Medium zu untersuchen. Mit Hilfe eines umfangreichen pharmakologischen Versuchsansatzes soll aufgezeigt werden, in welchem Maße Geschlechtshormone wie Progesteron, 17 β -Estradiol und Testosteron einen Einfluss auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen haben. Dabei ist von besonderem Interesse, in wie weit unterschiedliche Rezeptortypen und Signalkaskaden am Wirkungsmechanismus beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wird gleichzeitig auch auf die beiden Pathologiemodelle der diabetischen Retinopathie und der postischämischen Retina eingegangen. Im Falle eines positiven Effekts, wird ebenfalls näher auf mögliche Signalwege und Wirkungsweisen der Hormone eingegangen werden. Im Falle eines positiven Effektes könnten sich dadurch neue Möglichkeiten für eine spezifischere Therapie von Ödemen, in Hirn und Netzhaut eröffnen.

1 Einleitung

Die Entwicklung eines Hirnödems ist einer der Hauptgründe für die hohe Sterblichkeitsrate bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen, wie z. B. dem Schädel-Hirn-Trauma, Hirntumoren oder Hirninfarkten. Die Pathogenese des Hirnödems ähnelt derer des retinalen Makulaödems. Es kann im Rahmen verschiedener Erkrankungen wie z.B. dem Diabetes Mellitus auftreten. Der Mechanismus von der Entstehung des Hirnödems so wie des Makulaödems ist noch nicht vollständig verstanden. Sowohl eine extrazelluläre Flüssigkeitsansammlung (Gass et al., 1985) als auch ein Schwellen der retinalen Gliazellen (Yanoff et al., 1984) tragen zur Entwicklung des Makulaödems bei. Ähnlich den Zellen der Blut-Hirn-Schranke, welche einigen Plasmaproteinen einen Transporter-vermittelten Ein- und Ausstrom ins Hirnparenchym erleichtern, besitzen Gliazellen Transporter und Ionenkanäle, die es ihnen ermöglicht ihrer Funktion, dem Erhalt der Volumen- und Ionenhomöostase der Netzhaut, gerecht zu werden. Eine Voraussetzung für diese Funktion ist dabei der Erhalt der zelleigenen Homöostase z.B. die Aufrechterhaltung des inneren Milieus, wie das Gleichgewicht der einzelnen Elektrolyte. Ein Funktionsverlust der Gliazellen und eine damit einher gehende gestörte retinale Ionen- und Volumenhomöostase kann eine Neurodegeneration bewirken. Ein Anschwellen der Gliazellen ist somit eine mögliche Ursache der Ödembildung und in der Retina.

Es ist bekannt, dass es unter hypoosmolaren Bedingungen in der postischämischen Retina zu einem Anschwellen der Gliazellen der Netzhaut, den Müllerzellen, kommt (Pannicke et al., 2004). Nach einer temporären Ischämie weisen die Gliazellen eine verminderte Kaliumleitfähigkeit auf. Ursächlich dafür ist eine herabgesetzte Expression ihres wichtigsten Kaliumkanals Kir4.1 in Membranarealen, die im Kontakt zu Blutgefäßen und den Glaskörper stehen. Demgegenüber bleibt die Expression der Aquaporin-4-Wasserkanäle (AQP4) nach einer kurzzeitigen Ischämie nahezu unverändert. Die verminderte Kaliumleitfähigkeit der Müllerzellen bewirkt eine intrazelluläre Anreicherung von K^+ -Ionen und führt somit zu einem osmotischen Gradienten zwischen Extra- und Interzellularraum. Die erhöhte intrazelluläre K^+ -Konzentration zieht einen osmotischen Wassereinstrom in die Zelle nach sich und führt letztendlich zu einem Anschwellen der Müllerzelle.

Die Annahme, dass eine verminderte Kaliumleitfähigkeit zu einem veränderten Schwellungsverhalten der retinalen Gliazellen führt, konnte durch die Blockade der K^+ -Kanäle in der gesunden Kontrollnetzhaut bestätigt werden. Zur Blockade diente dabei eine Bariumsulfatlösung in einer Konzentration von 1mM. Die Müllerzellen der Kontrollnetzhäute schwollen in Anwesenheit von Ba^{2+} -Ionen, sobald sie einer hypotonen Lösung ausgesetzt wurden, an (Pannicke et al., 2004).

Weiterhin haben verschiedene Arbeiten gezeigt, dass Geschlechtshormone wie Progesterone und 17β -Estradiol intrazerebral und auch in der Retina unter ischämischen Bedingungen neuroprotektiv wirken (Draca et al., 2009). Ein inhibitorischer Einfluß auf die Ödembildung könnte für diesen protektiven Effekt verantwortlich sein. Dieser positive Einfluss hinsichtlich einer Reduzierung des Ödems ist wohl auf verschiedene Mechanismen wie eine Steigerung der Angiogenese und Neurogenese sowie antiinflammatorischer Effekte und der Wirkung als Antioxidans zurück zuführen (Liu M et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Geschlechtshormonen auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen der Ratte in hypoosmolarem Medium untersucht. Mit Hilfe eines umfangreichen pharmakologischen Versuchsansatzes wurde untersucht, in welchem Maße Geschlechtshormone wie Progesteron, 17β -Estradiol und Testosteron einen Einfluss auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen haben und welche Rezeptortypen und Signalkaskaden am Wirkungsmechanismus beteiligt sind.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Retina

Die Retina kann als ein leistungsstarker Bildprozessor gesehen werden. Sie analysiert das eingehende Lichtmuster und leitet diese Informationen an höher gelegene visuelle Zentren des Gehirns weiter (Masland et al., 2001). Embryonal geht die Retina aus einer Ausstülpung des Zwischenhirnbodens hervor. Gegenüber anderen Teilen des zentralen Nervensystems bietet die Retina den Vorteil, dass sie sehr gut zugänglich und ihre Struktur sowie Funktionen umfassend bekannt sind. Im Lichtmikroskop erkennt man eine auffällige Schichtung der Netzhaut. In den einzelnen Schichten sind charakteristische Zelltypen und subzelluläre Kompartimente lokalisiert. In der äußeren Schicht der Netzhaut wandeln die fotorezeptiven Zellen die einfallenden Photonen in elektrische Signale um und leiten sie weiter an die innere Schicht der Netzhaut. Dabei sind verschiedene Arten von Interneuronen zu komplexen Schaltkreisen verbunden, so dass die erzeugten Impulse einer ersten Verarbeitung unterzogen werden können. Zu ihnen gehören die Horizontalzellen, die Bipolarzellen und die Amakrinen Zellen. Nach der Weiterverarbeitung erreichen die Signale die Ganglienzellen, welche in der innersten Zellschicht lokalisiert sind. Ganglienzellen sind die „Outputneurone“ der Retina. Sie kodieren und komprimieren die Signale in eine Sequenz von Aktionspotentialen. Von hier aus werden die verarbeiteten Informationen über den Sehnerv an die nächsten Schaltstellen außerhalb der Netzhaut weitergeleitet (Masland et al., 2001). Die Funktionen und Aufgaben der Gliazellen werden in der Retina neben den Astrozyten fast ausschließlich von speziellen Makrogliazellen, den Müllerzellen, wahrgenommen. Zur Untersuchung glialer Aufgaben kann die Retina daher als Modellsystem für das Gehirn dienen (Reichenbach 1999; von Engelhardt und Breves 2005; Schnorr und Kressin 2006). Lange war man der Ansicht, dass Gliazellen ein Stützgerüst für die Nervenzellen bilden und als elektrische Isolation der Neuronen dienen. Neuere Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass Gliazellen eine entscheidende Rolle bei der Modulation der neuronalen Aktivität, dem Stoff- und Flüssigkeitstransport sowie der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn spielen (Reichenbach 1999; Färber und Kettenmann 2005).

2.2 Die Müllerzelle

Die Anfänge der wissenschaftlichen Untersuchungen der Netzhaut berufen sich auf Heinrich Müller. Dabei wurde erstmals Genaueres zur Histologie der Netzhaut und Funktion der Müllerzelle bekannt. Die Müllerzelle durchzieht in ihrer Länge die Retina. Müllerzellen sind

die Hauptgliazellen in der Wirbeltiernetzhaut. Die Zellkörper der Müllerzellen befinden sich in der inneren Körnerschicht. Allerdings stehen sie über zahlreiche Fortsätze im engen Kontakt mit nahezu allen Nervenzelltypen der Netzhaut. So wirken sie als Bindeglied zwischen Neuronen und den am ständigen Austausch von Substanzen beteiligten Strukturen, wie den Blutgefäßen oder dem Glaskörper. Müllerzellen sind mit zahlreichen verschiedenen Ionenkanälen, Rezeptoren und Enzymen ausgestattet (Bringmann A., 2004). Eine Besonderheit der Müllerzellen ist die hohe Kaliumleitfähigkeit ihrer Plasmamembran, welche unter anderem der Aufrechterhaltung der extrazellulären Kaliumhomöostase dient (Newman und Reichenbach 1996; Reichenbach 1999). Abgesehen von diesen Funktionen, sind Müllerzellen gleichermaßen für den neuronalen Metabolismus verantwortlich. Sie versorgen die Nervenzellen mit trophischen Substanzen, wie z. B. Laktat für den Citratzyklus (Reichenbach 1999).

Die Bedeutung der Müllerzellen hinsichtlich der Erhaltung von Strukturen und Funktionen in der Retina wird durch die Beobachtung bestätigt, dass eine gezielt induzierte Degeneration von Müllerzellen zu Fehlbildung und schließlich zur Degeneration der Retina führen kann (Dubois-Dauphin et al., 2000). Besonders in der gesunden Retina spielen Müllerzellen folgende Rolle:

- Steuerung des Glukose-Stoffwechsels und Bereitstellung von Metaboliten wie Laktat/Pyruvat für den oxidativen Stoffwechsel (Poitry-Yamate et al., 1995; Tsacopoulos und Magistretti 1996).
- Regulierung des Blutflusses in der Retina (Paulson und Newman 1987) und Mitwirkung an der Bildung und Aufrechterhaltung der Barriere zwischen Blutkreislauf und der Retina (Tout et al., 1993).
- Modulation neuronaler Signalverarbeitung durch die schnelle Aufnahme und das Recyclen von Neurotransmittern (Matsui et al., 1999).
- Erhalt der Ionen- und Wasserhomöostase der Retina, einschließlich des pH-Wertes (Newman 1996; Newman und Reichenbach 1996; Bringmann et al., 2004)

Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass Neurone der Retina, besonders Photorezeptorzellen, höchst sensibel auf pathologische Veränderung, die mit unzureichender Blutversorgung einher gehen, reagieren. Im Gegensatz dazu, zeigen Müllerzellen eine bemerkenswerte Resistenz gegenüber ischämischen Bedingungen, die zu Sauerstoffmangel und Hypoglykämie führen (Silver et al., 1997; Stone et al., 1999). Für die Resistenz entscheidend könnte der komplexe Energiestoffwechsel der Zellen sein, welcher primär über Glykolyse bestritten wird und damit unabhängig von oxidativer Phosphorylierung bzw. O₂-Versorgung

durch das Blut ist. So sind Müllerzellen dazu im Stande, die meisten Beeinträchtigungen bzw. Verletzungen zu überstehen und eine entscheidende Rolle während pathogener Ereignisse zu spielen.

2.3 Das Hirn- bzw. Netzhautödem

Primäre Erkrankungen des Gehirns, wie der Schlaganfall, das Schädel-Hirn-Trauma (Kimmelberg et al., 1995) oder Hirntumore (Papadopoulos et al., 2001) stehen häufig in Verbindung mit einem Hirnödem. Der intrakranielle Druck wird durch das Anschwellen des Gewebes erhöht, was letztendlich zur Beeinträchtigung der Gefäßperfusion und schließlich zur Ischämie des Gehirns führen kann (Papadopoulos et al., 2001). Vergleichbar mit dem Hirnödem tritt im Auge das Makulaödem auf. Die Pathogenese basiert gleichermaßen auf ischämisch-hypoxischen Zuständen (Yanoff et al., 1984). Das Makulaödem ist einer der Hauptgründe für eine Verschlechterung der Sehkraft bei Erkrankungen des Auges, wie z. B. der Uveitis (Regenbogenhautentzündung) oder dem Diabetes mellitus. Es tritt ebenfalls gehäuft bei Patienten nach Katarakt-Operation (Linsentrübung des Auges) auf. Eine Ischämie der Netzhaut, oxidativer Stress und Entzündungsprozesse sind Faktoren die an der Entstehung eines Makulaödems mitwirken können. Ein bedeutender Aspekt in der Pathogenese eines Ödems kann eine gesteigerte Permeabilität der Blut-Netzhaut-Schranke, welche von dem Gefäßendothel- und den Pigmentepithelzellen der Netzhaut ausgebildet wird (Cunha-Vaz and Travassos, 1984). Eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße, die die Fovea (Fovea centralis= Bereich des schärfsten Sehens der Netzhaut) umgeben und der Pigmentepithelschicht der Netzhaut, kann eine Ansammlung von Flüssigkeit innerhalb des subretinalen Raumes und des Gewebes der Fovea zur Folge haben. Das sogenannte vasogene Ödem kann somit ein Ablösen der Makula vom Pigmentepithel induzieren. Die Flüssigkeitsansammlung bewirkt, dass Neurone und Blutgefäße komprimiert werden; das Gewebe ist einer Hypoxie ausgesetzt. Darüber hinaus verlängert sich die Diffusionsstrecke für metabolische Substrate und Sauerstoff. Die draus resultierende Unterversorgung führt letztlich zur Degeneration der retinalen Neuronen.

Vasoaktive Faktoren wie Prostaglandine, Interleukin-1 β und Tumor-Nekrose-Faktor, bewirken eine erhöhte Gefäßpermeabilität, was einer Störung der Blut-Gefäß-Schranke gleich kommt (Caldwell et al., 2005). Darunter scheint VEGF (vasuklar endothelial growth factor) das bedeutendste Zytokin zu sein. Die Entwicklung des chronischen Makulaödems hängt von zwei entscheidenden Faktoren ab. Dem Maß an Flüssigkeitsaustritt aus den Blutgefäßen, und der Effizienz von Absorptionsmechanismen von der Netzhaut zurück ins Blut. Eine beeinträchtigte Flüssigkeitsadsorption aus dem Gewebe der Retina stellt einen essentiellen Faktor in der Pathogenese der Ödembildung da. Diese Annahme wird durch die

Beobachtung bestärkt, dass sich ein Makulaödem auch trotz intakter Blutgefäße entwickeln kann (Mori et al., 2002).

Als Ursache für die Entstehung des Makulaödems wird ebenfalls eine Funktionsschädigung des retinalen Pigmentepithels (RPE) diskutiert (Kanksi et al., 2004). Dabei kommen die Pigmentepithelzellen ihrer Transportfunktion nicht mehr nach, so dass sich Stoffwechselprodukte anhäufen, welche sich in Form von sogenannten Drusen zwischen RPE und Bruchmembran ablagern. Die Pigmentepithelzellen gehen zugrunde, in der Bruchmembran entstehen Lücken (Patzelt et al., 2005).

Weiterhin ist bekannt, dass ein Anschwellen von Müllerzellen der Entstehung eines Makulaödems voraus geht. Die zystoide Form des Makulaödems geht mit großen Zysten in den inneren nukleären und äußeren plexiformen Schichten der Makula einher. Histologische Daten deuten darauf hin, dass die typischen ödematösen Zysten im Netzhautgewebe von absterbenden und anschwellenden Müllerzellen hervorgerufen werden (Fine and Brucker 1981; Yanoff et al., 1984).

Die Entstehung eines Makulaödems ist Kennzeichen für verschiedene inflammatorische und ischämische Erkrankungen der Netzhaut. Die Ausbildung eines zytotoxischen Ödems, das heißt eine intrazelluläre Flüssigkeitsansammlung wie beim Anschwellen von Gliazellen der Retina, könnte zur pathologischen Ansammlung von Flüssigkeit im Netzhautgewebe beitragen. In dieser Arbeit soll anhand von Tiermodellen untersucht werden, inwieweit ein verändertes Schwellungsverhalten der Müllerschen Gliazellen an den pathologischen Veränderungen der Netzhaut beteiligt sein könnte. Eine genaue Analyse des Mechanismus für Gliazellschwellung soll Ansatzpunkte für neue Therapien zur Behandlung von Makulaödemem aufzeigen.

2.4 Volumenhomöostase der Retina

Für eine intakte neuronale Informationsverarbeitung ist eine effiziente Regulation der Ionenhomöostase der Netzhaut von besonderer Bedeutung. Mit Hilfe von sogenannten einwärtsgerichtenden („inwardly rectifying“, Kir) Kaliumkanälen sorgen Müllerzellen für ein Gleichgewicht der extrazellulären Kaliumkonzentration $[K^+]_e$. Durch Kir-Kanäle werden überschüssige K^+ -Ionen aus dem Extrazellulärraum aufgenommen und an anderer Stelle wieder in große Flüssigkeits-gefüllte Kompartimente, wie z.B. den Blutkreislauf oder den Glaskörper abgegeben (Newman EA. Reichenbach A., 1996). Untersuchungen haben gezeigt, dass unterschiedliche Typen von Kir-Kanälen existieren (Raap et al., 2002). Von besonderer Bedeutung ist das Kir4.1-Protein, was von Müllerzellen überwiegend im Bereich

von Kontakten zu Blutgefäßen und dem Glaskörper exprimiert wird (Nagelhus et al., 1999). Diese Beobachtung und der Fakt, dass Wasserkanaäle, so genannte Aquaporine (AQP), in diesem Bereich ko-exprimiert werden, gibt Anstoß zur Annahme, dass der Wassertransport in der Retina mit K^+ -Strömen gekoppelt ist (Nagelhus et al. 1999). Ein solcher transzellulärer Abtransport ist wichtig um das Gewebe vor Flüssigkeitsansammlungen auf Grund des konstanten Wassereintroms ins Gewebe zu bewahren. Grund sind physiologische Prozesse, wie der Augeninnendruck, die Aufnahme von osmotisch aktiven Metaboliten aus dem Blut, als auch die intensive oxidative ATP-Synthese in retinalen Neuren (Kandel et al., 1996).

AQP sind Proteine, welche Wasser-durchlässige Poren in der Zellmembran bilden. Von diesen Wasserkanälen sind bisher etwa 13 Subtypen bekannt (Verkman u. Mitra, 2000; Adams HA et al. 2005). Die Subtypen AQP 1, 4 und 9 wurden vorwiegend im Zentralnervensystem lokalisiert. AQP4 wird vornehmlich in glialen und ependymalen Zellen exprimiert, und insbesondere an astrozytären Endfüßen konnte eine Kollokalisierung mit K^+ -Kanälen nachgewiesen werden (Knepper MA et al., 1997; Rash JE et al., 1998; Nagelhus et al., 1999, 2004). Quantitative Messungen ergaben, dass AQP4 vornehmlich in Müllerzellen und den Astrozyten des Nervus Opticus exprimiert wird (Erlend et al., 1998). Unter physiologischen Bedingungen und vor allem während neuronaler Aktivität besteht die Aufgabe von AQP vermutlich in einer erleichterten Aufnahme von an K^+ -gekoppeltes Wassers in den Intrazellulärraum der Gliazellen. Das somit stabilisierte extrazelluläre Kaliumgleichgewicht gewährleistet ein konstantes Membranpotential der Nervenzellen.

2.5.1 Schwellungsverhalten von Müllerzellen

Bei der Entwicklung von Ödemen in der Retina spielen Müllerzellen eine wichtige Rolle. Der zugrunde liegende zelluläre Mechanismus der Müllerzellschwellung ist bis heute nicht ausreichend bekannt. Pannicke et al. (2004) bewiesen bereits, dass Müllerzellen der postischämischen Retina unter hypotonen Bedingungen anschwellen. Eine solche Volumenzunahme konnte bei Kontrollzellen der gesunden Retina nicht beobachtet werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Volumenregulation von Gliazellen durch Gabe von Bariumionen gehemmt werden kann (Newman 1989). Nach einer temporären Ischämie ist die K^+ -Leitfähigkeit der Müllerzellen und deren Expression des Kir4.1-Proteins im Bereich der Blutgefäße und an den Grenzflächen zum Glaskörper stark reduziert. Im Unterschied dazu zeigt sich die Expression der AQP4-Wasserkanaäle größtenteils unverändert. Laut Pannicke et al. (2004) erklärt sich der Vorgang der Gliazellschwellung wie folgt: Die Kaliumaufnahme in Müllerzellen durch die stark einwärtsrektifizierenden Kir2.1-

Kanäle ist unverändert bzw. nur schwach reduziert. Aufgrund der Herunterregulation der Expression des Kir4.1-Proteins wird die Abgabe von K^+ -Ionen in das Blut oder den Glaskörper verhindert. Es kommt zu einer Ansammlung von K^+ -Ionen in den Zellen, was wiederum aufgrund des osmotischen Gradienten einen durch AQP4 vermittelten Wassereinstrom in die Zellen bewirkt.

2.5.2 Rezeptor-vermittelte Hemmung des Schwellungsverhaltens von Müllerzellen

Astrozyten setzen Transmitter wie Glutamat und ATP frei (Filosa A et al., 2009). Diese Transmitter regulieren durch ihre autokrine Funktion das zelluläre Volumen. Setzt man Gliazellen hypoosmolarem Stress in Gegenwart von entzündlichen Mediatoren aus und blockiert ihre Kaliumkanäle, induziert man ein Anschwellen der Zellen. VEGF verhindert die Zellschwellung in Netzhautpräparaten oder isolierten Müllerzellen. Dieser Effekt wird durch Aktivierung einer Kinase vermittelt, welche am flk-1-Rezeptor eine Kalzium-abhängige Freisetzung von Glutamat und darauffolgend eine Stimulierung der I/II metabotropen Glutamatrezeptoren in den Gliazellen bewirkt. Damit wird eine autokrine, purinerge Signalkaskade aktiviert, welche die Müllerzellschwellung unterbindet. Die Kaskade ist Kalzium-abhängig und verursacht durch die Freisetzung von ATP und Adenosin die Aktivierung des purinergen P2Y1-Rezeptors und des Adenosin A1-Rezeptors. Die Aktivierung dieser beiden Rezeptoren führt zu einem Öffnen von Kalium- und Chlorid-Kanälen und letztendlich zur Hemmung einer möglichen Schwellung der Gliazellen. Die Glutamat- und Purin-gesteuerte Regulation des Gliazellvolumens scheint für die Homöostase des Extrazellulärraumes eine entscheidende Rolle zu spielen, vor allem während starker neuronaler Aktivitäten, die mit einer Schwellung neuronaler Zellstrukturen in der Netzhaut verbunden sind (Wurm et al., 2008).

2.6 Sexualsteroid

Sexualsteroid und ihre verwandten Substanzen gehören weltweit zu den am häufigsten verordneten Pharmaka und leisten große Dienste an Diagnostik, Therapie und Prophylaxe zahlreicher Erkrankungen. Sexualsteroid fördern im Allgemeinen die Zellteilung und die Zunahme des Zellvolumens (Gruber et al., 2002). Sie unterstützen die Blutzufuhr, fördern die Retention von Wasser und Elektolyten, die Anhäufung von Aminosäuren und die Synthese von Proteinen (Gruber et al., 2002). 17β -Estradiol ist z.B. ein multifunktionelles Hormon mit antientzündlichen, antiapoptotischen und antioxidativen Eigenschaften (Behl et al., 1997). Klinische Studien haben gezeigt, dass 17β -Estradiol sowohl in Fällen von Hirnödemen

entzündlicher Genese als auch in Fällen von akuten Verletzungen der Wirbelsäule, eine Ödementwicklung unterdrücken konnte (Dubal et al. 1999; Jover et al. 2002).

Sexualhormone wirken durch Bindung an die klassischen intrazellulären Hormonrezeptoren. Dabei handelt es sich um ligandenabhängige Transkriptionsaktivatoren. Es werden neben der klassischen Steroidwirkung an vielen zellulären Systemen alternative Steroidwirkungen beobachtet. Diese „nicht-genomische“ rasche Steroidwirkungen wird über membranständige Signalproteine wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ausgelöst (Lösel et al., 2003). Diese Steroidrezeptoren interagieren direkt mit der Proteintyrosinkinase Src, wodurch die MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) aktiviert wird. Zudem ist seit langen bekannt, dass Neurosteroiden wie 3 α -reduzierte Metaboliten des Progesterons, aber auch klassische Sexualhormone wie 17 β -Estradiol die Funktion von Ionenkanälen beeinflussen (Lösel et al., 2003).

Swiatek-De Lange et al. untersuchten bereits 2007 die Wirkungsweise von Progesteron und dessen membranständige Rezeptoren in der Retina. Dabei konnte die membranständige Progesteron-Rezeptor-Komponente PGRMC1 ermittelt werden. Swiatek-De Lange et al. kamen zu der Erkenntnis, dass PGRMC1 vorwiegend in Müllerzellen und dem Pigmentepithel der Retina exprimiert wird. Zudem konnten sowohl intrazelluläre Androgen-, Estrogen- und Progesteronrezeptoren (PR) (Wickham et al., 2000) als auch verschiedene spezifische Membranproteine für Steroide (Cenedella et al., 1999) in verschiedenen Gewebetypen des Auges nachgewiesen werden.

Im ZNS synthetisierte Neurosteroiden werden aus dem Cholesterolderivat Pregnenolon gebildet. Pregnenolon wird in den Ganglienzellen der Retina synthetisiert. In Ganglienzellen und Amakrinzellen der adulten Ratte (Cascio C et al., 2002) sowie in Amakrinzellen von embryonalen Mäusen (Compagnone and Mellon, 2000) konnte eine hohe Aktivität von 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β -HSD) und P450_{c17} nachgewiesen werden. 3 β -HSD und P450_{c17} sind Hauptenzyme der Synthese von Steroiden. Die Aktivität der Enzyme weist auf eine Synthese von Neurosteroiden in der Retina hin. Steroide beeinflussen die Degeneration von Neuronen bei zahlreichen Erkrankungen der Retina, wie z. B. der Diabetischen Retinopathie (Sone et al., 1996), der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) und der retinalen Ischämie (Guarneri et al., 1994). Über die Steroidproduktion werden möglicherweise zelluläre Anpassungsprozesse nach einem pathologischen Geschehen und die Erhaltung der Volumenhomöostase in den Zellen reguliert, wodurch ihre neuroprotektive Rolle begründet werden könnte.

Der genaue Mechanismus und die Funktionsweise der Rezeptoren von Steroidhormonen in der Retina sind noch weitgehend ungeklärt.

2.7 Zielsetzung der Doktorarbeit

Vor dem Hintergrund dieser bisherigen Daten soll untersucht werden, welche Wirkungen Sexualsteroiden in der vitalen Netzhaut haben. Dabei ist von besonderem Interesse, ob Steroide wie Progesteron und Estradiol Auswirkungen auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen in Modellen der postischämischen und diabetischen Retina haben. Bei positivem Effekt bezüglich des Schwellungsverhaltens, soll genauer auf mögliche Signalwege und Wirkungsweisen der Hormone eingegangen werden. Im Falle eines positiven Effektes könnten sich dadurch neue Möglichkeiten für eine spezifischere Therapie von Ödemen, in Hirn und Netzhaut eröffnen.

3 Tiere, Material und Methoden

Sämtliche Versuche wurden im Rahmen des laufenden Forschungsprogramms der Universität Leipzig am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung Pathophysiologie der Neuroglia, durchgeführt.

3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Long-Evans-Ratten (250-350g) aus dem Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät bezogen. Bei den Ratten wurde nicht zwischen weiblichen und männlichen Tieren unterschieden. Mit Hilfe von Kohlendioxid wurden die Tiere unmittelbar vor den Versuchen getötet, um vitale Netzhautpräparate zu gewinnen. Sämtliche Versuche fanden gemäß den Deutschen Tierschutzrichtlinien statt. Alle Tiere wurden in ausreichend großen Käfigen gehalten und erhielten Futter und Wasser ad libitum. Des Weiteren wurde auf einen strengen Hell-Dunkel-Rhythmus über jeweils 12h geachtet.

3.2 Verwendete Lösungen und Substanzen

3.2.1 Extrazelluläre Lösung (EZL)

Die EZL-Lösung hatte in der Vorbereitung und während den Versuchen die Funktion der Kontroll-Perfusionslösung für die Retina. Mit einer konstanten Konzentration an folgenden Elektrolyten wurde das Gleichgewicht für die in vitro Messungen aufrecht erhalten.

Die EZL enthielt:

NaCl	136mM	(Carl Roth, Karlsruhe, BRD)
KCl	3mM	(Carl Roth, Karlsruhe, BRD)
MgCl ₂	1mM	(Sigma, Steinheim, BRD)
CaCl ₂ 2mM (Merck, Darmstadt, BRD)	2mM	(Merck, Darmstadt, BRD)
HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	10mM	(Carl Roth, Karlsruhe, BRD)
Glucose	11mM	(Merck, Darmstadt, BRD)

Mit dem Zusatz von Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS-Base, Carl Roth, Karlsruhe, BRD) konnte der physiologische pH-Wert von 7,4 eingestellt werden. An den einzelnen Versuchstagen wurde die Lösung immer frisch angesetzt.

3.2.2 Hypotone Lösung

Die hypotone Lösung wurde durch Verdünnung der Extrazellulärlösung (entspricht der physiologischen Osmolarität) mit Aqua bidest. hergestellt. Die Ionenkonzentrationen wurden auf 60% der Ausgangsosmolarität eingestellt.

3.2.3 Lösungen mit Barium-Ionen (Ba^{2+})

Ba^{2+} lag als Chloridsalz vor. Die Stammlösung wurde aus $BaCl_2$ (Sigma, Steinheim, BRD) und Aqua bidest. hergestellt. Diese Ba^{2+} -Lösung diente zur Anfertigung der Perfusionslösung mit einer 1mM Ba^{2+} -Konzentration. 10 Minuten vor Beginn der Aufzeichnungen am Mikroskop wurden die vorbereiteten Schnitte der Retina mit der 1mM normotonen Ba^{2+} -Lösung vorinkubiert. Genau wie der normotonen Lösung wurde auch der hypotonen Lösung 1 mM Ba^{2+} zugesetzt.

3.2.4 Vitalfarbstoff

Zur Darstellung der Müllerzellen der Retina mittels Laser Scanning Mikroskopie wurde der Vitalfarbstoff Mitotracker Orange (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Mit Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, Steinheim, BRD) wurde zunächst die 1 mM Stammlösung angesetzt und schließlich mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung von Biochrom AG, Berlin, BRD) auf eine Konzentration von 10 μ M verdünnt. Die Endkonzentration des Farbstoffs Mitotracker Orange von 1 μ M während der Messung ergab sich durch das hinzu pipettieren von 200 μ l der 10 μ M Farbstofflösung in die 2 ml Lösung der Perfusionskammer. Vor der Messung wurden die Schnitte der Retina für eine ausreichende Färbung 5 min mit 1 μ M Mitotracker Orange inkubiert (Uckermann et al. 2004).

3.3 Sexualsteroid

Um den Einfluß von Progesteron, 17 β -Estradiol, Testosteron und Estriol auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen zu untersuchen, wurden folgende Stocklösungen

hergestellt: Progesteron 10 μM , 17 β -Estradiol 50 μM und Estriol 50 μM (Sigma Aldrich). Alle Steroide wurden ohne Vorinkubation direkt mit der hypotonen Testlösung ko-appliziert.

3.4 Verwendete Testsubstanzen

Zur Untersuchung eines möglichen aktivierten Signalweges, wurden die einzelnen Sexualsteroiden mit den in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen getestet.

Tab. 1

Bezeichnung, Konzentration (Konz., in μM , nM, mM) und Wirkungsweise der Testsubstanz, die zur Ermittlung eines möglichen Signalweges verwendet wurde.

Testsubstanz	Konzentration	Wirkung
AA (Arachidonsäure, Sigma, Taufkirchen, BRD)	10 μM	Adenosinrezeptoragonist
Adenosin (Sigma, Taufkirchen, BRD)	10 μM	Entzündungsmediator Aktivierung von P1 Rezeptoren (dazu gehören A_{1A} , A_{2A} , A_{2B} , A_3)
ARL- 67156 (6-N,N-Diethyl- β - γ -dibromomethylen-D-adenosin-5'-triphosphat; Sigma, Taufkirchen, Germany)	50 μM	selektiver Antagonist der Ekto-ATP-ase
ATP (Adenosintriphosphat) (Sigma, Taufkirchen, BRD)	200 μM	Agonist purinerger Rezeptoren
Bromo (4-bromophenacyl bromide), (Sigma, Taufkirchen, BRD)	500 μM	Hemmstoff der Phospholipase A2
CPCCOEt (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK)	20 μM	Antagonist des metabotropen Glutamatrezeptor1
DPCPX (8-Zyclopentyl-1,3-dipropylxanthin; Sigma, Steinheim BRD)	100 nM	Antagonist des Adenosin A_1 - Rezeptor
DTT (Dithiothreitol), (Sigma, Taufkirchen, BRD)	3mM	Reduktionsmittel

Indo (Indometacin), (Sigma, Taufkirchen, BRD)	10µM	Cyclooxygenase-Hemmstoff (COX-1 und COX-2)
LY341495 ((2S)-2-Amino-2-((1S,2S)-2-karboxyzykloprop-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propansäure; Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK)	100µM	selektiver Antagonist der metabotropen Glutamatrezeptoren 2 und 3
MRS2179 (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK)	30µM	spezifischer P2Y1-Antagonist
NBTI (S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosin; Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD)	10µM	selektiver Antagonist des Nukleosid-Transporters
PPADS (Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure; Sigma, Taufkirchen, BRD)	200µM	Selektiver Antagonist verschiedener purinerger Rezeptoren
SU1498 (Tyrphostin; Sigma, Taufkirchen, BRD)	10µM	Selektiver Antagonist des KDR/flk-1; VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor
TTX (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK)	1µM	Selektiver Blocker von spannungsabhängigen Na ⁺ -Kanälen

3.5 Ischämie Modell

Zunächst wurde eine intramuskuläre Ketamin/Xylazin-Anästhesie eingeleitet (100 mg/kg Körpergewicht Ketaminhydrochlorid und 5mg/kg Körpergewicht Xylazin). In die vordere Augenkammer des zu behandelnden Auges wurde von der Pars plana ausgehend eine Infusionsnadel (27G) gelegt. Die Infusionsnadel wurde mit einem Infusionsbeutel physiologischer Kochsalzlösung verbunden. Durch Anheben des Infusionsbeutels wurde der Augeninnendruck für 60 min auf 160 mmHg erhöht, so dass es zum Druck-bedingten Verschluss der retinalen Blutgefäße kam. Die transiente retinale Ischämie wurde nur an einem Auge der Ratten durchgeführt. Das andere Auge blieb unbehandelt und diente der Kontrolle.

3.6 Diabetes Modell

Für das diabetische Tiermodell wurden drei sechs Wochen alte Ratten mit einem Gewicht von ca. 350g verwendet. Bei den Tieren wurde durch eine einzelne intravenöse Injektion von Streptozocin (65 mg/kg Körpergewicht verdünnt in 0,03 M Zitratpuffer, pH 7,4) eine diabetische Stoffwechsellaage induziert. Streptozocin gehört der Substanzklasse der Glucosamine und Nitrosoharnstoffe an und ist spezifisch toxisch für insulinproduzierende Betazellen der Langerhansschen Inseln in der Bauchspeicheldrüse. Streptozocin wird vermehrt in der experimentellen Medizin zum Auslösen eines Diabetes Mellitus in Versuchstieren genutzt. Der Blutzuckerwert wurde regelmäßig mit Hilfe eines Blutzuckermessgerätes aufgezeichnet (Accu-Chek, Roche Diagnostics). Am Ende der Untersuchung lag der Blutzuckerwert bei den Kontrolltieren um $4,8 \pm 0,1$ mM, und um die $27,7 \pm 0,5$ mM bei den mit Streptozocin behandelten Tieren. Um eine zu große Gewichtsabnahme bei den Tieren zu vermeiden, wurde bei Blutglukosewerten über 33,3 mM Insulin (Lantus insulin, Aventis Pharma; 2 Einheiten 3mal/Woche) bei Bedarf subkutan injiziert. Vier Monate nach der Streptozocin-Injektion wurden die Tiere durch Kohlenstoffdioxid getötet und ihre Augen für die weiteren Untersuchungen entnommen.

3.7 Präparation der Netzhaut

Nach Enukleation des Auges wurde die Kornea mit der Linse durch einen kreisförmigen Schnitt entlang der Ora serrata entfernt. Anschließend wurde der verbleibende Augenbecher am Sehnervstumpf fixiert, der Glaskörper losgelöst und die Netzhaut mit einer speziellen Pinzette vom Pigmentepithel abgelöst und schließlich abgestreift, um sie in einem gesonderten Gefäß zu bearbeiten.

Mit Hilfe eines Membranfilters (Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) wurde die Retina nun so auf präpariert und mit einer feinen Pinzette fixiert, dass die Photorezeptorschicht dem Filter zugewandt lag. Um einer Austrocknung der Retina vorzubeugen, fanden sämtliche Arbeitsschritte in mit EZL-Lösung gefüllten Petrischalen statt (Abb. 1).

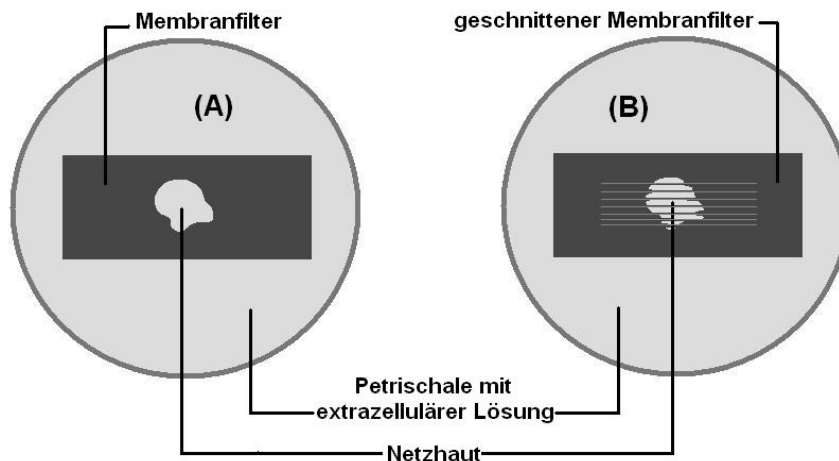


Abbildung 1

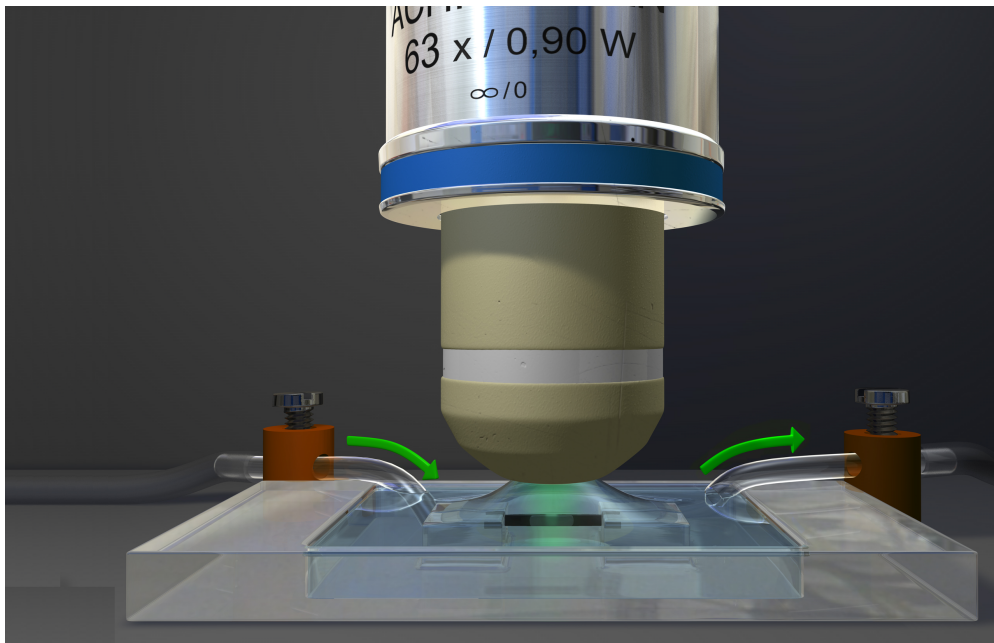
(A) Schematische Darstellung der auf dem Filter fixierten Retina (Aufsicht). Die Retina wird in einer mit Extrazellulärlösung gefüllten Schale auf dem Membranfilter fixiert, indem sie an den Rändern vorsichtig mit einer Pinzette angedrückt wurde. Die Retina ist so auf dem Filterstreifen aufgebracht, dass sie mit der Photorezeptorschicht diesem zugewandt liegt.

(B) Schematische Darstellung der retinalen Schnittpräparate (Aufsicht). Mit Hilfe einer Schneidevorrichtung wurde die Netzhaut in 1mm breite Streifen geschnitten.

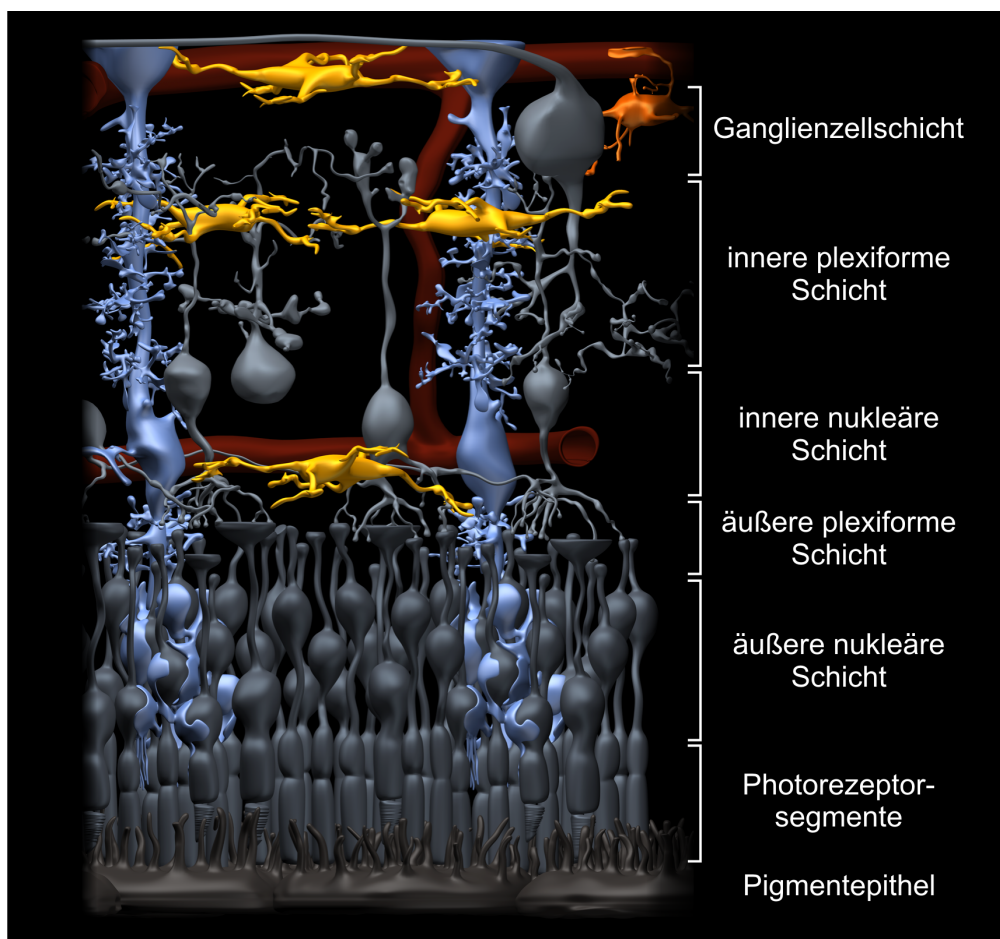
3.8 Anfertigen von Schnittpräparaten der Retina

Der Membranfilter inklusive der aufliegenden Retina wurde mittels einer speziellen Schneidevorrichtung in ein Millimeter große Schnitte geteilt (Abb. 1B). Die Streifen wurden im folgenden Schritt in einer Perfusionskammer gelegt, um sie gleichzeitig mit der entsprechenden Lösung sowie dem Farbstoff zu umspülen und später im Mikroskop untersuchen zu können.

Die Objektträgerähnliche Perfusionskammer bestand aus ca. 5 mm tiefem Plexiglas, in dessen Mitte eine Aussparung für die Lösungen existierte. In dieser Aussparung waren zu jeder Seite zwei kleine Würfel eingelassen, die als Aufhängung für die Schnittpräparate dienten (Abb.2A). In dieser Kammer konnte die Retinastreifen während den Messungen ständig mit der jeweiligen Lösung umspült werden.



(A)



(B)

Abbildung 2

(A) Schema der Perfusionskammer mit Membranfilter und der aufliegenden Netzhaut (Aufsicht). In der Perfusionskammer wird das Schnittpräparat zwischen den beiden Plexiglaswürfeln fixiert.

(B) Schema der Netzhaut. Während der Messung am LSM werden die Müllerzellsomata (blau) in der inneren nukleären Schicht aufgezeichnet. Neuronale Zellen (grau), Mikrogliazellen (gelb), Blutgefäße (rot).

3.9 Versuchsschema und Durchführung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Volumenregulation von Müllerzellen unter osmotischem Stress und den Einfluss von Sexualhormonen. In jeder Versuchsreihe wurden sowohl Kontrollen in hypotoner Extrazellulärlösung (EZL60) und hypotoner Extrazellulärlösung, welcher Bariumionen zugesetzt wurde (Ba60), durchgeführt. Die zu testenden Substanzen wurden mit Hilfe eines festen Schemas appliziert. Einige der Substanzen wurden vor Applikation in normotoner Bariumionen-haltiger-Lösung 15-45 min vorinkubiert.

Die präparierte Retina wurde in die mit Perfusionslösung gefüllte Messkammer gegeben und Mitotracker hinzugefügt. Die fluoreszenzgefärbten Müllerzellsomata wurden mittels eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops 510 Meta (LSM, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in der inneren nukleären Schicht (INL) bei 40facher Vergrößerung dargestellt (Uckermann et al. 2004). Anschließend wurde die Perfusion nach dem jeweiligen Perfusionsschema gestartet und die Aufzeichnung der Müllerzellsomata mit einer Geschwindigkeit von 1 Bild pro Sekunde begonnen.

3.10 Aufnahmen der Müllerzellsomata mit dem Laser-Scanning-Mikroskop

Sämtliche Untersuchungen der retinalen Schnitte wurden mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Microscope LSM 510 Meta (Zeiss, Oberkochen, BRD) und der vom Hersteller dazu gelieferten Bildanalyse Software (LSM Image Browser Rel. 4.1, Zeiss) durchgeführt. Der Vorteil eines solchen Mikroskops gegenüber einem herkömmlichen Lichtmikroskop liegt darin, dass durch eine zusätzliche Lochblende Fluoreszenzsignale, die außerhalb des Fokusbereiches liegen, zurückgehalten werden. Es wird eine optimale Auflösung im Vergleich zu einem konventionellen Lichtmikroskop erreicht, da die nichtfokussierten Areale nicht in die Bildentstehung einfließen.

Der verwendete Farbstoff Mitotracker Orange wurde mit Hilfe eines Helium Neon Lasers bei einer Wellenlänge von 543 nm angeregt und die Emissionen unter Verwendung eines 560nm Langpassfilters aufgezeichnet. Im Rahmen der Untersuchung wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (Archoplan 40 x 0,75, Zeiss, Oberkochen, BRD) genutzt.

Sämtliche Aufnahmen wurden bei einer Bildgröße von 57,6 x 57,6 μm angefertigt. Die Untersuchungsebene lag dabei im Bereich des größten Querschnitts, der zu untersuchenden Müllerzellsomatas. Die Müllerzellsomata wurden über einen Zeitraum von ca. 300s mit einem Abstand von 1s aufgezeichnet, wodurch eine mögliche Veränderung der Müllerzellsomafläche messbar wurde.

3.11 Ausmessen der Müllerzellquerschnittsfläche

Im Anschluß an die Durchführung des Versuchs wurden Veränderungen der Müllerzellquerschnittsflächen mittels der LSM Bild Analysesoftware ausgewertet. Dabei wurde manuell die größte Fläche bzw. Querschnitt der Somata einer Müllerzelle umrandet. Mittels dieses Bildbearbeitungsprogramms erhält man Werte in μm^2 die der Fläche der Müllerzellen zu Beginn und am Ende jeder Messung entsprechen.

Während den Messungen zum zeitlichen Verlauf der Müllerzellschwellung und deren Hemmung wurden die Müllerzellsomata alle 30s über einen Zeitraum von insgesamt 300s gemessen. Durch Messung der Somafläche zu vier verschiedenen Zeitpunkten:

- In normotoner Lösung: von 0 bis 30s nach Beginn der Messung
- In Hypotoner Lösung: bei 270 bis 300s nach Beginn der Messung

ließ sich eine Veränderung der Somafläche über den Zeitraum des Versuchs (ca. 5min) messen.

Die 4 Flächenwerte der Somata wurden anschließend im Statistikprogramm Graph Pad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) analysiert (siehe statistische Analyse). Durch Mitteln der ersten zwei Werte (von 0 bis 30s) zum einem Durchschnittswert und Division jeden Wertes durch die Mittelwerte, ergaben sich relative Werte in Bezug auf die Somafläche während der Perfusion mit normotoner Lösung, die in Prozent angegeben werden. Der Wert 100% bedeutet folglich, dass keine Veränderung bezüglich der Müllerzellfläche auftrat, wie das bei den Kontrollversuchen in hypotoner EZL bei gesunden Müllerzellen entsprechend der Daten aus vorangegangenen Studien (Pannicke et al., 2004) zu erwarten war.

Bezüglich der Auswertung aller Versuche wurden die so ermittelten Prozentwerte für die relative Somafläche des jeweils 4. Messwertes, d.h. 300s nach Versuchsbeginn, zusammengefasst und der Mittelwert mit Hilfe des Graph Pad Programms errechnet und dargestellt.

3.12 Statistische Analyse

Mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) wurde die statistische Analyse durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte $MW \pm SEM$ (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben, wobei n die Anzahl der gemessenen Zellen wiedergibt. Es wurde der Mann-Whitney Tests (nicht parametrisch, zweiseitig) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Das Schwellungsverhalten von Müllerzellen unter hypoosmolaren Bedingungen

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurde das Schwellungsverhalten von Müllerzellen unter hypotonen Bedingungen untersucht. Das Phänomen der Müllerzellschwellung wurde bereits in früheren Veröffentlichungen beschrieben. Die Müllerzellsomata in der inneren Körnerzellschicht der Netzhaut wurden mittels einer Vitalmarkierung (Uckermann et al. 2004) sichtbar gemacht und während des gesamten Verlaufs des Experimentes aufgezeichnet (Abb. 3A). Als Maß für ein Anschwellen der Zellen wurde die Veränderung der Querschnittsfläche der Müllerzellsomata ermittelt. Diese Experimente machten deutlich, dass gesunde Müllerzellen unter hypotonen Bedingungen nicht anschwellen, während durch Blockade der Kaliumauswärtsströme der Müllerzellen durch Ba^{2+} eine Volumenzunahme ausgelöst werden kann (Abb. 3).

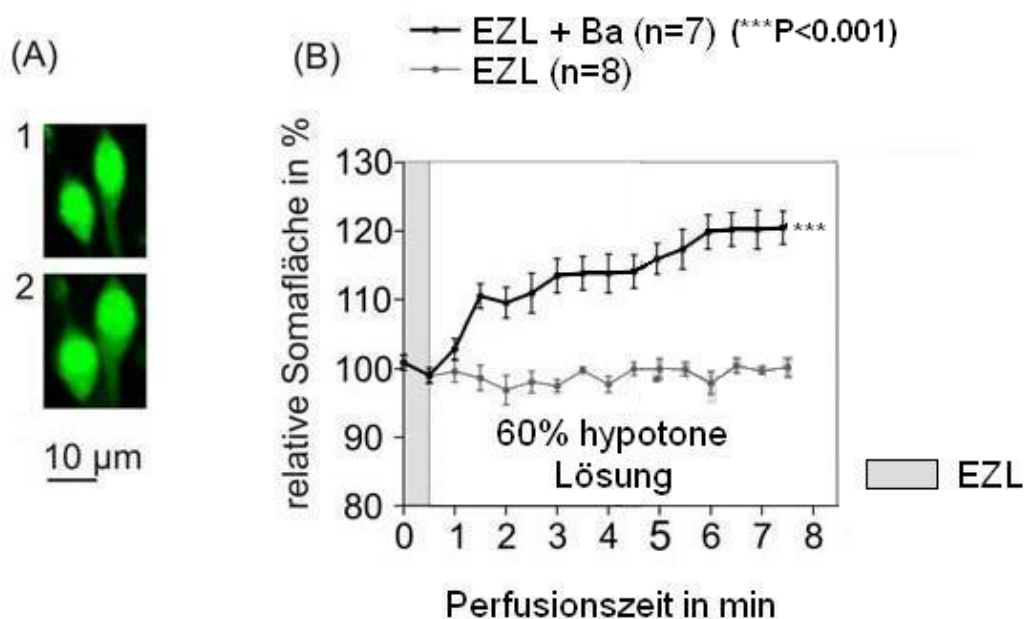


Abbildung 3

(A) Originalaufnahmen von mit Mitotracker Orange gefüllten Müllerzellsomata der Netzhaut vor (1) und nach (2) Verringerung der Kontrollosmolarität (60% der Kontrollosmolarität) nach Inkubation mit Ba^{2+} (1mM).

(B) Veränderung der Müllerzellsomafläche in % während der Perfusion mit hypotoner Lösung mit und ohne Ba^{2+} -Zusatz. Müllerzellen, die zuvor mit einer Ba^{2+} -Lösung vorinkubiert wurden, zeigten unter hypoosmolaren Bedingungen ein Anschwellen ihrer Somaflächen (schwarze Kurve). Kontrollzellen der

gesunden Retina zeigten unter gleichen hypoosmolaren Bedingungen, jedoch ohne Zusatz von Ba^{2+} , keine Zunahme der Müllerzellsomafläche (graue Kurve). Sie behielten ihre Größe über den gesamten Zeitraum der Messung bei. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($***P<0.001$) zwischen der relativen Somafläche der Müllerzellen in hypotoner Ba^{2+} -Lösung gegenüber der von Müllerzellen in hypotoner EZL nach vierminütigem hypotonen Stress. Dargestellt sind die MW \pm SEM mehrerer Zellen.

Weiterhin wurden in meiner Arbeit zwei im Labor bereits etablierte Modelle für Netzhauterkrankungen eingesetzt; ein Ischämie-Reperusionsmodell an der Ratte sowie ein Model für die diabetische Retinopathie. Bei Schnitten von postischämischen (Abb. 4A) sowie diabetischen (Abb. 4B) Netzhäuten konnte eine deutliche und schnelle Zunahme des Müllerzellvolumens unter hypotonen Bedingungen beobachtet werden, während die Gliazellkörper in den unbehandelten Kontrollnetzhäuten unter hypotonen Bedingungen unverändert blieben.

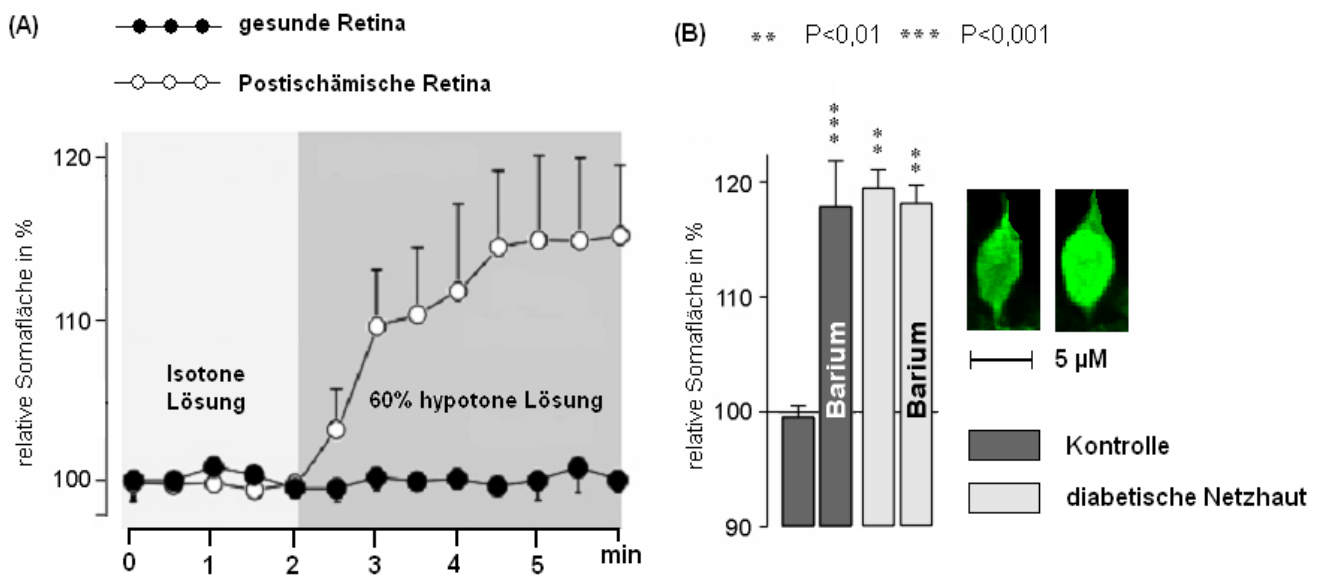


Abbildung 4

Schwellungsverhalten von Müllerzellen in der postischämischen und diabetischen Netzhaut der Ratte
(A) Zeitabhängige Veränderung der Querschnittsfläche der Zellsomata während des Versuchsablaufs. Die Müllerzellsomata der postischämischen Netzhaut schwellen sobald hypotone Perfusionslösung in die Meßkammer eingewaschen wurde. Dagegen konnte in der gesunden Retina keine nennenswerte Veränderung festgestellt werden. Die Müllerzellsomata der gesunden Netzhaut behielten ihre Größe bei. Alle Werte sind relativ gegenüber den Ausgangswerten (100%) angegeben. Die Werte stammen

vom unbehandelten Kontrollauge (Zellzahl n=5) bzw. dem behandelten Auge einer Ratte, bei der 3Tage zuvor eine HIOP am rechten Auge durchgeführt worden war (Zellzahl n=6).

(B) Schwellung der Müllerzellen eines diabetischen Versuchstieres (Zellzahl n=10) und der Müllerzellsomata der gesunden Netzhaut eines Kontrolltieres. Müllerzellen retinaler Schnitte diabetischer Versuchstiere, die mit hypoosmolarer Perfusionslösung behandelt wurden, zeigten ähnlich der Zellen im ischämischen Reperusionsmodell ein deutliches Anschwellen ihrer Zellkörper. Zellen der Kontrolltiere zeigten keine Veränderung bezüglich ihres Schwellverhaltens. Signifikanter Unterschied gegenüber Zellen der gesunden Kontrollnetzhaut (100%): **P<0.01; ***P<0.001.

4.2 Beteiligung von Entzündungsmediatoren und oxidativem Stress an der Entstehung von Gliazellschwellung

Sowohl im Falle einer Ischämie wie auch bei der diabetischen Retinopathie ist die Netzhaut inflammatorischen Mediatoren und hypoxischem Stress ausgesetzt. Setzt man gesunde Gliazellen hypoosmolarem Stress in Gegenwart von inflammatorischen Mediatoren aus, induziert man ein Anschwellen der Zellen. Im hier vorliegenden Tiermodell testete ich, in wie weit sich die Anwesenheit von Entzündungsmediatoren in den Meßlösungen auf die Volumenregulation der Müllerzellen auswirkt. Die Gabe von Arachidonsäure, Prostaglandin E₂ oder Wasserstoffperoxid induziert ein Anschwellen der glialen Zellkörper in der Kontrollnetzhaut unter hypoosmolaren Bedingungen. Im Gegensatz dazu konnte man ein Schwellen der Zellen in Abwesenheit dieser Mediatoren nicht ermitteln (Abb. 5A). Ein Anschwellen der Gliazellen in der Kontrollretina konnte jeweils durch eine Blockade der Bildung von Arachidonsäure und Prostaglandinen mit Hilfe des selektiven Inhibitors der Phospholipase A₂, 4-Bromophenacylbromid, und dem Cyclooxygenase-Blocker Indomethacin verhindert werden (Abb. 5B). Das Anschwellen von Müllerzellen in Kontrollnetzhäuten konnte ebenso durch das zellpermeable Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) gehemmt werden (Abb. 5B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass oxidativer Stress, Prostaglandine und Arachidonsäure Faktoren sind, deren Wirkung die Volumenregulation von Müllerzellen beeinträchtigt - die Zellen schwellen an. Arachidonsäure und Prostaglandine sind starke Hemmstoffe der ATP-abhängigen Natrium-Kalium-Pumpe. Es wurde gezeigt, dass eine Blockade der Natriumkanäle eine intrazelluläre Überladung mit Ionen und damit verbunden ein Anschwellen kultivierter Gliazellen (Staub et al. 1994; Owada et al., 1999) bewirkt. Die Behandlung der Netzhaut mit der Natrium-Ionophore Monensin führte in meinen Messungen ebenfalls zu einer Schwellung der Gliazellsomata in der gesunden

Kontrollnetzhaut unter hypotonen Bedingungen (Abb. 5B). Weiterhin wurde die Zunahme der Gliazellsomaflächen in der gesunden Netzhaut in Anwesenheit von Ba^{2+} durch Ko-Applikation von natriumfreier Extrazellulärlösung unterdrückt (Abb. 5B). Diese Daten lassen vermuten, dass ein Anschwellen der Gliazellen durch einen intrazellulären Überschuss an Natrium herbeigeführt wird; höchstwahrscheinlich verursacht durch die Hemmung der ATP-abhängigen Natrium-Kalium-Pumpe in Anwesenheit der Entzündungsmediatoren.

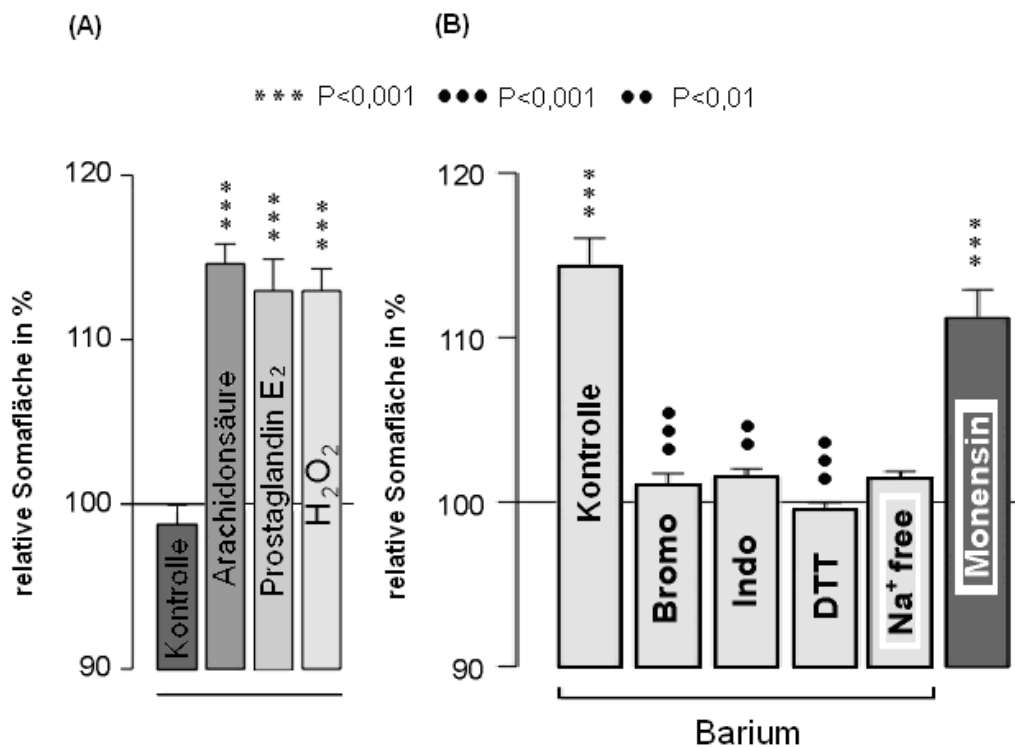


Abbildung 5

(A) Durch Perfusion gesunder Netzhäute mit folgenden Agenzien wurde in hypoosmolarer Lösung ein Anschwellen von Gliazellen induziert: Arachidonsäure (AA; 10 μM), Prostaglandin E₂ (PGE₂; 30 nM) und H₂O₂ (50 μM).

(B) Ein Anschwellen der Gliazellen konnte jeweils durch Perfusion der Netzhautschnitte mit hypoosmolarer Ba^{2+} -Lösung (1mM) und der Natrium-Ionophore Monensin ((30 μM) beobachtet werden. Folgende Substanzen konnten eine durch Applikation von Ba^{2+} induzierte Gliazellschwellung verhindern: Hemmstoff der Phospholipase A₂, 4-Bromophenylacylbromid (Bromo; 500 μM), der Cyclooxygenasehemmstoff Indomethazin (Indo; 10 μM), das Reduktionsagens Dithiothreitol (DTT; 3 mM) und natriumfreie Extrazellulärlösung.

Die Daten ergeben sich aus einer durchschnittlichen Veränderung der Somafläche (n=6-15 Zellen pro Balken). Die Werte wurden 4 min nach der Perfusion mit hypotoner Lösung gemessen und sind relativ zu den Ausgangswerten (100%) angegeben (\pm SEM). Signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollmessung in Abwesenheit von Ba^{2+} (100%): **P<0,01; ***P<0,001. Signifikante Unterbindung der Schwellung: **P<0.01; ***P<0.001.

4.3 Wirkung von Geschlechtshormonen auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen

Klinische Studien machten deutlich, dass Geschlechtshormone wie 17 β -Estradiol und Progesteron in Gehirn und Retina neuroprotektiv wirken können (Dubal et al., 1999; Jover et al., 2002). Die Entstehung eines Ödems ist eine charakteristische Komplikation von zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen. Es hat sich gezeigt, dass Geschlechtshormone in Fällen von Hirnödemen eine Ödementwicklung unterdrücken konnten (Prokai et al., 2003). Um die Wirkung von Geschlechtshormonen auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen zu untersuchen, wurden einzelne Netzhautschnitte mit verschiedenen Steroiden in hypoosmolarer Lösung perfundiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Hormone Progesteron, Testosteron, 17- β Estradiol und Estriol ein Anschwellen der Müllerzellsomata in der postischämischen Netzhaut verhindern (Abb. 6A). In weiteren Experimenten konzentrierte ich mich auf die Wirkungsmechanismen von Progesteron und fand heraus, dass in mit Bariumchlorid, Arachidonsäure, Prostaglandin E₂ und Wasserstoffperoxid vorbehandelten Kontrollnetzhäuten Progesteron ein Anschwellen der Müllerzellsomata verhindern konnte (Abb. 6B). Interessant ist zudem, dass Progesteron die durch Barium induzierte Schwellung auch an frisch isolierten Gliazellen hemmt (Abb. 6C). Das lässt auf eine direkte Wirkung an den Gliazellen schließen.

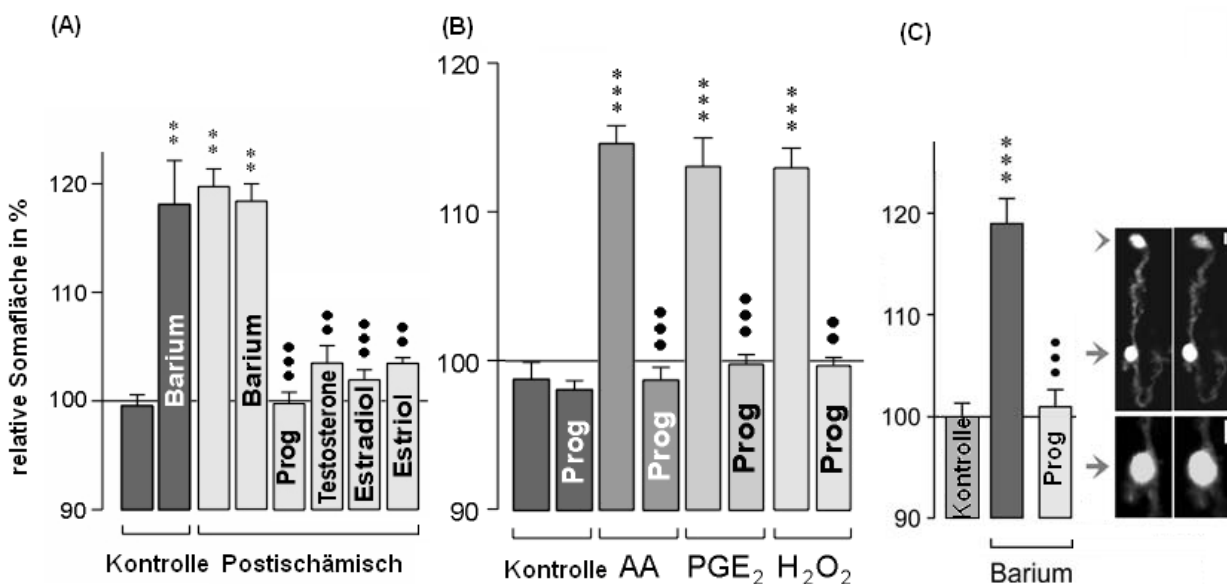


Abbildung 6

(A) Während Müllerzellen in Kontrollnetzhäuten nicht anschwellen bzw. ein Anschwellen nur durch Applikation von Ba²⁺ induziert werden kann, zeigen Müllerzellen aus der postischämischen Netzhaut in hypotoner Lösung bereits in Abwesenheit von Ba²⁺ eine signifikante Zunahme der Somafläche.

Progesteron, Testosteron (Test; 50 μM), 17 β -Estradiol (50 μM) und Estriol (50 μM) dagegen verhindern ein Anschwellen der Müllerzellen der postischämischen Netzhaut.

(B) Die durch Applikation von Arachidonsäure (AA; 10 μM), Prostaglandin E2 (PGE2; 30 nM) und H₂O₂ (50 μM) induzierte Zellschwellung kann durch Zugabe von Progesteron in Kontrollnetzhäuten unterbunden werden.

(C) Progesteron verhindert auch an isolierten Müllerzellen aus Kontrollnetzhäuten ein durch Ba²⁺-Gabe induziertes Anschwellen der Zellen. Die Bilder zeigen eine isolierte Müllerzelle vor und nach einem 4-minütigen hypotonen Reiz. Der Pfeil markiert das Müllerzellsoma, der Pfeilkopf den Müllerzellendfuß. Größenmaßstab 5 μm .

Die Daten ergeben sich aus einer durchschnittlichen Fläche der Gliazellsomata (n=6-15 pro Balken). Die Werte wurden 4 min nach der Perfusion mit hypotoner Lösung gemessen und sind relativ zu den Ausgangswerten (100%) angegeben (\pm SEM). Signifikanter Unterschied gegenüber Zellen der gesunden Kontrollnetzhaut (100%): **P<0,01; ***P<0,001. Signifikante Unterbindung der Schwellung: ••P<0.01; •••P<0.001.

4.4 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Geschlechtshormonen

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass Geschlechtshormone das Schwellen der Müllerzellsomata der gesunden Netzhaut in hypoosmolaren Medium in Anwesenheit von Ba²⁺ hemmen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Wirkung für Progesteron, 17 β -Estradiol, Estriol und Testosteron konzentrationsabhängig ist. Dazu wurden die Substanzen in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe getestet. In Abbildung 7 ist die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Progesteron auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellsomata der gesunden Netzhaut unter hypoosmolaren Bedingungen in Anwesenheit von Ba²⁺ dargestellt. Progesteronkonzentrationen von 100 und 10 μM verhinderten ein Anschwellen der Müllerzellsomata: niedrigere Progesteronkonzentrationen (0,1 μM , 0,01 μM und 0,001 μM) beeinflussten das Schwellungsverhalten bedeutend weniger oder gar nicht. 17 β -Estradiol zeigte bei Konzentrationen von 100 und 50 μM einen die Schwellung annähernd vollständig unterbindenden Effekt. Niedrigere Konzentrationen (Werte von 10 μM bis 1 μM) zeigten ähnlich wie bei der Messung für Progesteron keine Schwellungsinhibition. Insgesamt zeigten alle Geschlechtshormone eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Volumenregulation der Müllerzellen (Abb. 7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten Geschlechtshormone eine schwellungsinhibierende Wirkung unter hypoosmolaren Bedingungen in pathologisch

veränderten Netzhäuten erzielt. Dabei wird die gleiche hemmende Wirkung der Steroide in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba^{2+} beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in weiteren pharmakologischen Untersuchungen die Applikation von Ba^{2+} in hypoosmolarem Medium als Modell für die Veränderung im ischämischen Tiermodell, wo die Kaliumleitfähigkeit durch pathologische Prozesse ebenfalls drastisch vermindert wird, eingesetzt.

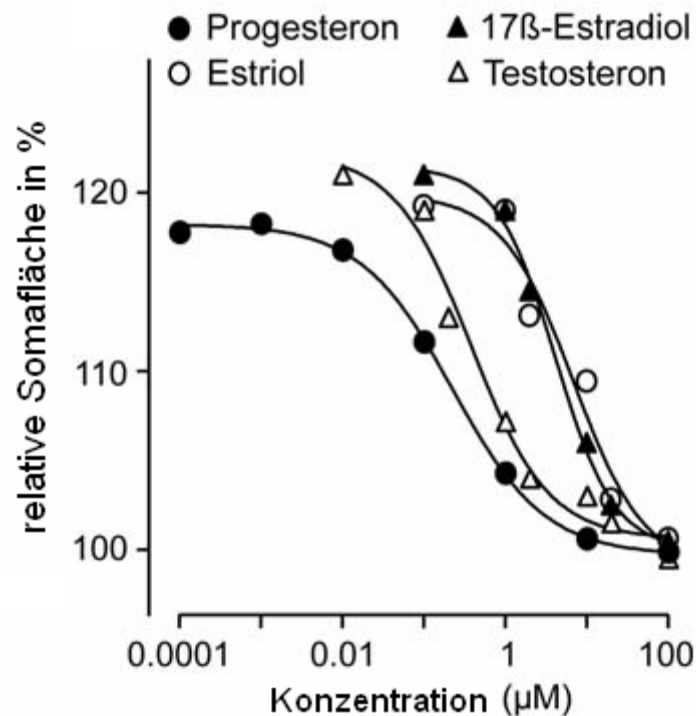


Abb. 7

Geschlechtshormone wirken schwellungsinhibitorisch auf Müllerzellen. Gleichzeitig mit der hypotonen Perfusionslösung wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen von Geschlechtshormonen appliziert. Progesteron, 17 β -Estradiol, Testosteron und Estriol verminderten konzentrationsabhängig das Schwellen von Müllerzellen in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba^{2+} .

Die Daten ergeben sich aus einer durchschnittlichen Fläche der Gliazellsomata. Die Werte wurden 4 min nach der Perfusion mit hypotoner Lösung gemessen und sind relativ zu den Ausgangswerten (100%) angegeben (\pm SEM).

4.5 Rezeptor-vermittelte Hemmung des Schwellungsverhaltens von Müllerzellen

Es wurde beschrieben, dass VEGF (Vascular endothelial growth factor) die osmotische Schwellung der Gliazellen in der Netzhaut hemmt, indem es eine komplexe purinerge

Signalkaskade aktiviert (Wurm et al., 2008). In meiner Arbeit konnte ich nochmals belegen, dass die Müllerzellschwellung in Schnitten postischämischer Netzhäute jeweils durch Glutamat, Adenosin-5-Triphosphat (ATP) und Adenosin verhindert wurde (Abb. 8).

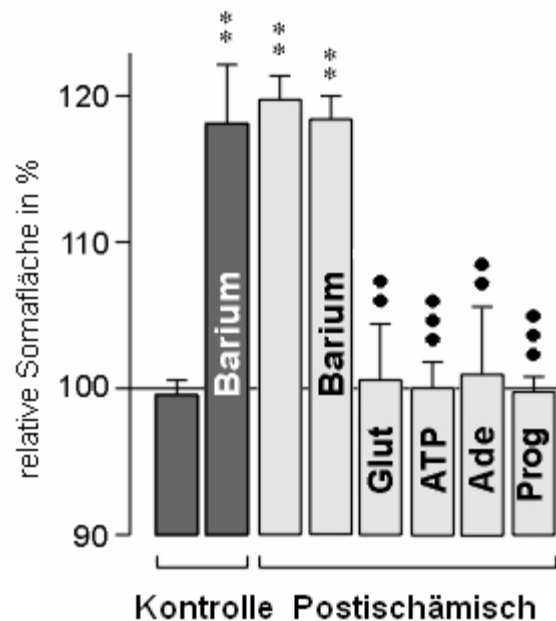


Abbildung 8

Die Netzhautschnitte wurden mit folgenden Substanzen getestet: Bariumchlorid (1mM), Glutamat (Glut; 1 mM), ATP (200 μ M), Adenosin (Ade; 10 μ M) und Progesteron (Prog; 10 μ M). Alle Werte sind relativ gegenüber den Ausgangswerten (100%) angegeben. Die Kontrollzellen (je n=5) stammen aus einem unbehandelten Tier. Diese wurden mit Zellen (jeweils n=6) aus postischämischen Netzhäuten, welche drei Tage nach der Ischämie-Reperfusion entnommen wurden, verglichen. Die Balken für die jeweils getestete Substanz geben den durchschnittlichen (\pm SEM) Wert der glialen Somafläche nach 4minütiger Perfusion an. Signifikanter Unterschied gegenüber Zellen der gesunden Kontrollnetzhaut (100%): **P<0.01. Signifikante schwellungsinhibierende Wirkung: **P<0.01; ***P<0.001.

Um zu prüfen, ob der hemmende Effekt auf das Schwellungsverhalten durch die hier untersuchten Geschlechtshormone durch eine Transaktivierung von VEGF-, Glutamat- und bzw. oder purinerger Rezeptoren herbeigeführt wird, testete ich verschiedene die einzelnen Rezeptoren blockierende Substanzen. Wie in Abb. 9A zu sehen, konnte die schwellungshemmende Wirkung von Progesteron durch den vascular endothelial growth factor (VEGF)-2-Rezeptorblocker, SU1498, nicht unterdrückt werden. Ebenso, konnte keine Blockade des schwellungsinhibierenden Effektes von Estradiol durch Koapplikation von SU1498 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Anhand dieser Daten kann die Möglichkeit, dass die Geschlechtshormone eine Freisetzung von VEGF aus den Zellen auslösen, ausgeschlossen werden. Jedoch erbrachten Messungen mit LY341495, einem Antagonisten für metabotrope Glutamat-Rezeptoren der Gruppe II, dass dieser die Wirkung

von Progesteron aufhebt (Abb. 9A). Das könnte auf eine durch Progesteron hervorgerufene Freisetzung von Glutamat aus den Gliazellen mit anschließender Aktivierung der metabotropen Glutamatrezeptoren hindeuten.

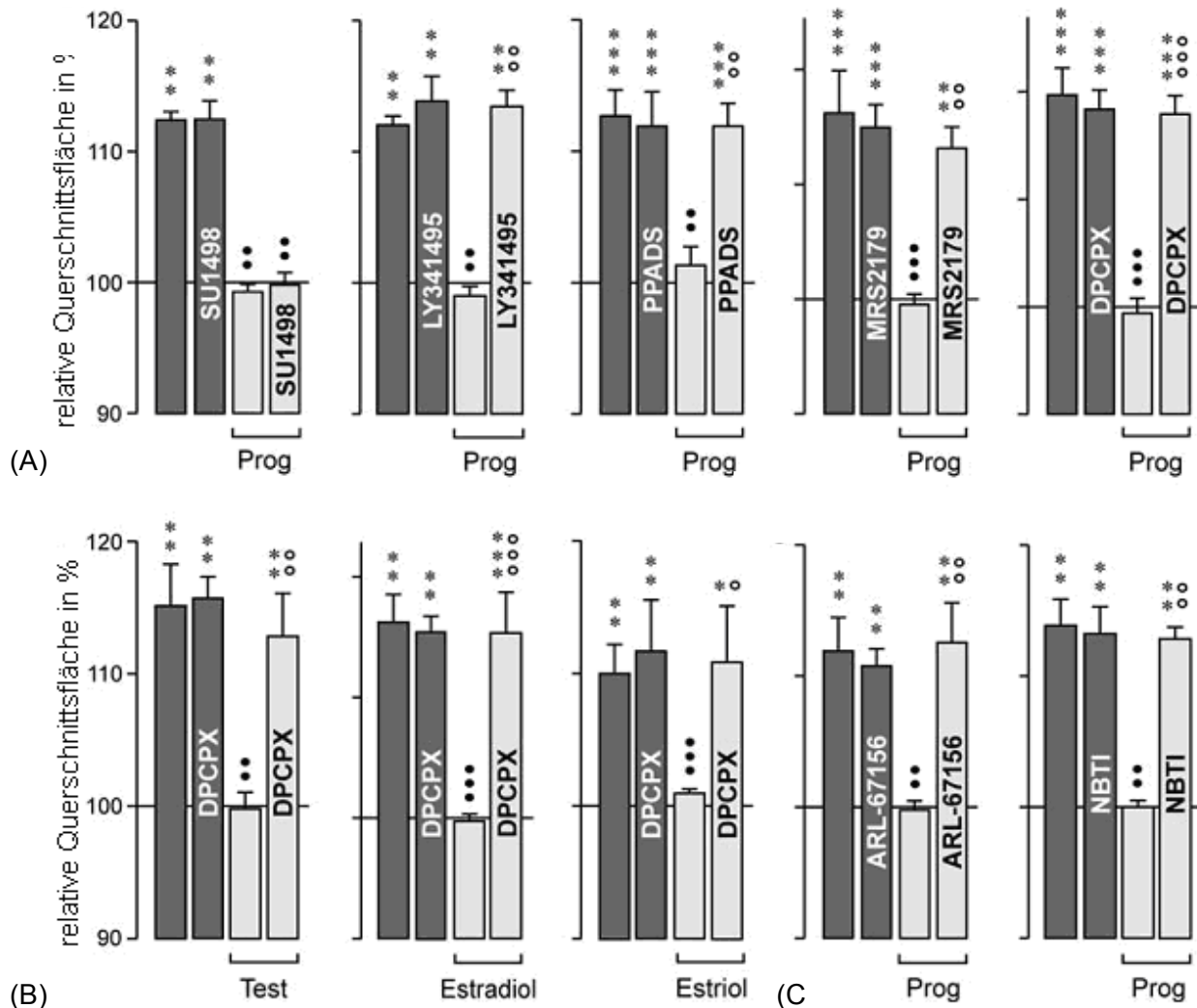


Abbildung 9

(A) Die schwellungshemmende Wirkung von Progesteron (Prog; 10 µM) wird durch folgende Agenzien aufgehoben werden: dem Gruppe II metabotropen Glutamatrezeptor-Antagonisten (mGluRs), LY341495 (100 µM); einem Hemmstoff verschiedener Subtypen purinerger Rezeptoren, PPADS (200 µM); dem Antagonist des P2Y₁-Rezeptors, MRS2179 (30 µM); und dem Antagonisten des Adenosin A₁-Rezeptors, DPCPX (100 nM). Der selektive Antagonist des KDR/flk-1, SU1498 (10 µM), zeigte keinen hemmenden Effekt auf die Wirkung von Progesteron.

(B) DPCPX (100 nM), der Antagonist des A₁-Rezeptors, konnte jeweils den Effekt von Testosteron (Test; 50 µM), von 17β-Estradiol (50 µM) und Estriol (50 µM) unterbinden.

(C) Der schwellungsinhibierende Effekt von Progesteron (Prog; 10 µM) wurde durch ARL-67156 (50 µM), einem ecto-ATPase Inhibitor und NBTI (10 µM), einem Antagonisten des Nukleosidtransporters, blockiert. Die Daten ergeben sich aus einer durchschnittlichen (± SEM) Fläche der Gliazellsomata

(n=5-22 pro Bar). Die Werte wurden 4 min nach der Perfusion mit hypotoner Lösung gemessen und sind relativ zu den Ausgangswerten (100%) angegeben. Signifikanter Unterschied gegenüber Zellen der gesunden Kontrollnetzhaut (100%): *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Signifikante Unterbindung des Effekts der Geschlechtshormone: ◯P<0,5; ◯◯P<0,01; ◯◯◯P<0,001.

Weiterhin untersuchte ich, ob die schwellungsinhibitorische Wirkung von Progesteron jeweils durch verschiedene Substanzen, welche die purinerge Signalkaskade blockieren, unterdrückt werden konnte. In dieser Substanzgruppe wurden Rezeptorblocker, wie PPADS, ein P2Y₁-selektive Antagonist, MRS2179 und der Adenosin A₁ Rezeptorantagonist, DPCPX (Abb. 9A), eingesetzt. Jede der genannten Substanzen verhinderte den schwellungsinhibitorischen Effekt von Progesteron. Ferner inhibierte DPCPX die Wirkung von Testosteron, 17β-Estradiol und Estriol auf das Schwellungsverhalten der Müllerzellen (Abb. 9B). Diese Daten weisen daraufhin, dass Geschlechtshormone über Glutamatfreisetzung und Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren eine Freisetzung von purinergen Rezeptoragonisten wie ATP und Adenosin aus Müllerzellen bewirken. Da der ecto-ATPase Hemmstoff ARL-67156 die Wirkung von Progesteron aufhebt, kann vermutet werden, dass ATP außerhalb der Zelle in ADP, einen bekannten Agonisten von P2Y₁ (Abbraccio MP et al., 2006), konvertiert wird (Abb. 9C). Um zu überprüfen, ob Adenosin durch Transporter aus den Zellen freigesetzt wird, wurde die Wirkung von NBTI, einem Antagonisten des Nukleosidtransporters, in Anwesenheit von Progesteron gemessen. Wie in Abbildung 9C zu sehen, konnte NBTI die Wirkung von Progesteron vollständig unterdrücken.

Auch in Müllerzellen der diabetischen Netzhaut, führt die Ko-Applikation von DPCPX mit Progesteron zu einem Verlust der schwellungsinhibitorischen Wirkung von Progesteron (Abb. 10), was bestätigt, dass die eben beschriebene Signalkaskade auch in der pathologisch veränderten Netzhaut durch Progesteron aktiviert werden kann.

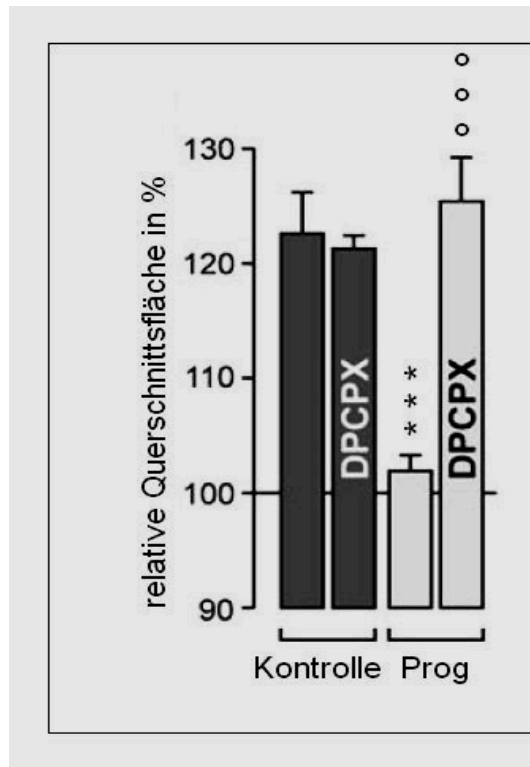


Abbildung 10

Das Schwellungsverhalten von Müllerzellen aus Netzhautschnitten diabetischer Tiere konnte durch die Anwesenheit von Progesteron verhindert werden. Der schwellungsinhibierende Effekt von Progesteron wurde durch Zugabe des Adenosin A₁-Rezeptorblockers DPCPX (100nM) aufgehoben. Signifikante Unterbindung der Schwellung: ***P<0.001. Signifikante Unterbindung des Effekts von Progesteron: oooP<0.001.

4.6 Einfluß spannungsabhängiger Natrium- und Calcium-Kanäle auf das Schwellungsverhalten Müllerzellen

Daten früherer Studien deuten darauf hin, dass VEGF in Gliazellen der Netzhaut eine exozytotische Freisetzung von Glutamat hervorruft (Wurm et al., 2008). Der hemmende Effekt von mGluR Antagonisten auf die Wirkung von Progesteron legt nahe, dass Progesteron ebenfalls eine Freisetzung von Glutamat aus den Müllerzellen induziert. Derzeit wird diskutiert, inwieweit spannungsabhängige Natrium- und Calciumkanäle, die in Gliazellen exprimiert werden, eine exozytotoxische Freisetzung von Glutamat unterstützen (Bringmann et al., 2000; Chao et al., 1994; Puro et al., 1991). Ich fand heraus, dass der Hemmstoff spannungsabhängiger Natriumkanäle, Tetrodotoxin (TTX; 1 µM), die schwellungsunterbindende Wirkung von Progesteron (10µM) in Netzhautschnitten vollständig unterdrücken konnte (Abb. 11).

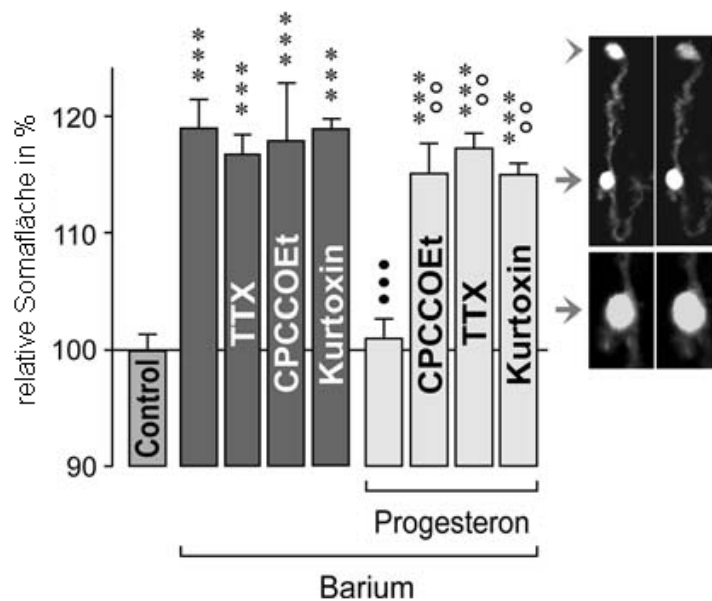


Abbildung 11

Der schwellungs-inhibitorische Effekt von Progesteron (10 μ M) an isolierten Müllerzellen konnte jeweils durch Co-Applikation folgender Substanzen unterdrückt werden: der Antagonist des metabotropen Glutamatrezeptor1, CPCCOEt (20 μ M), Tetrodotoxin (TTX; 1 μ M) und Kurtoxin (10 μ M). Die Daten ergeben sich aus einer durchschnittlichen (\pm SEM) Fläche der Gliazellsomata ($n=6-10$ per bar). Die Werte wurden 4 min nach der Perfusion mit hypotoner Lösung gemessen und sind relativ zu den Ausgangswerten (100%) angegeben. Signifikanter Unterschied gegenüber der gesunden Kontrollnetzhaute: *** $P<0.001$. Signifikante schwellungsinhibierende Wirkung durch Progesteron: ●● $P<0.001$. Signifikante Unterbindung des schwellungsinhibierenden Progesteroneffekts: ○○ $P<0.01$.

Um heraus zu finden, ob Tetrodotoxin seine Wirkung an Neuronen oder Gliazellen entfaltet, untersuchten wir den Einfluss von Tetrodotoxin zusätzlich an isolierten Gliazellen der Netzhaut. Wie in der Abbildung 11 zu sehen, konnten Tetrodotoxin die schwellungsinhibitorische Wirkung von Progesteron vollständig unterbinden. Zudem wurde an isolierten Zellen untersucht, ob auch spannungsabhängig Calciumkanäle an der von Progesteron vermittelten Freisetzung von Glutamat beteiligt sind. In der Tat blockiert Kurtoxin (inhibiert vor Allen Calcium-Kanäle vom T-Typ) den schwellungsinhibitorischen Progesteron-Effekt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Aktivierung von spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanälen der Gliazellen einen essentiellen Schritt in der durch Progesteron aktivierten Signalkaskade darstellt. Interessant ist, dass der Effekt von Progesteron an isolierten Müllerzellen auch durch CPCCOEt, einem Antagonisten des metabotropen Glutamat-1-Rezeptors, unterbunden werden konnte (Abb. 11), was die Annahme unterstützt, dass Glutamat aus den Müllerzellen freigesetzt wird und direkt wieder über metabotrope Glutamatrezeptoren deren Volumenregulation beeinflusst.

5 Diskussion

5.1 Ba^{2+} -Ionen induzierte Müllerzellschwellung als Pathologiemodell

Im Rahmen von Erkrankungen wie der retinalen Ischämie (Pannicke et al., 2004) und der diabetischen Retinopathie (Pannicke et al., 2006) kommt es zu pathologischen Veränderungen der Volumenhomöostase von Müllerzellen. Dem liegen eine Reduktion einwärtsgerichteter Kaliumströme und eine verminderte Expression der Müllerzell-spezifischen Kir4.1-Kanäle zu Grunde. Der verminderte bzw. fehlende Ausgleich an Ionenströmen führt zur Akkumulation von Wasser intrazellulär und letztendlich zu einem Anschwellen der Zellen (Dmitriev et al., 1999). Frühere Experimente haben ergeben, dass man mit Hilfe von Ba^{2+} -Ionen eine Blockade von Kir-Kanälen erzielen kann (Newman 1989). Damit gelang es schließlich eine funktionelle Störung zu simulieren, die sonst im Rahmen von pathologischen Veränderungen, wie einer Ischämie, auftritt (Pannicke et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde das Schwellungsverhalten von Müllerzellen in der Netzhaut unter hypoosmolaren Bedingungen nach Blockade der Kir-Kanäle mittels Ba^{2+} -Ionen untersucht. Durch Applikation der 60%-igen hypoosmolaren Lösung wurde ein Konzentrationsgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum erzeugt, der den Bedingungen im Gewebe bei Ödembildung ähnelt. Wurden zudem Ba^{2+} -Ionen ko-appliziert, zeigte sich eine Schwellung der Müllerzellsomata, während keine Zellschwellung in Abwesenheit von Ba^{2+} -Ionen beobachtet werden konnte. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Applikation von Ba^{2+} in hypoosmolarem Medium als Modell für die Veränderung im ischämischen Tiermodell, wo die Kaliumleitfähigkeit durch pathologische Prozesse drastisch vermindert wird, eingesetzt werden. Somit konnte der Einsatz von Tierversuchen, z.B. der Induktion von Netzhauterkrankungen am lebenden Tier, reduziert werden.

5.2 Einfluß von Entzündungsmediatoren und oxidativem Stress auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen

Osmotisch induziertes Anschwellen ist charakteristisch für Gliazellen in der diabetischen und ischämischen Netzhaut (Pannicke et al., 2004, 2006) und trägt möglicherweise zur Entwicklung von Netzhautödemen bei (Bringmann et al., 2004). In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass Sexualhormone ein Anschwellen von Gliazellen in diabetischen und ischämischen Netzhautgewebe verhindern. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Anlass zu

der Annahme, dass Geschlechtshormone ein zytotoxisches Ödem in der Netzhaut unterbinden können, indem sie einen Abtransport von Flüssigkeit aus dem ödematösen Gewebe induzieren.

Gliazellen können in der Anwesenheit von osmotischen Gradienten anschwellen. Derartige Gradienten können in situ im Bereich von gliovaskulären Verbindungen vorkommen, z.B. im Falle einer Hyponatriämie, Hypoalbuminämie und innerhalb des neuronalen Gewebes in Perioden gesteigerter Aktivität (Dmitriev et al., 1999). Bei gesteigerter neuronaler Aktivität kommt es zu einer Abnahme von Natriumchlorid in der Extrazellulärflüssigkeit, was den Anstieg von Kalium um den Faktor 2 begünstigt (Dietzel et al., 1989). Meine Ergebnisse zeigen, dass eine vermehrte Bildung von Entzündungsmediatoren und oxidativem Stress ein Anschwellen von Gliazellen zur Folge haben kann. Es wird angenommen, dass es hierbei zu einer Blockade der Natrium-Kalium-Pumpe kommt, was einen intrazellulären Natriumanstieg und letztendlich einen Wassereinstrom in die Zellen zur Folge hat. Arachidonsäure und ihre Metaboliten, insbesondere Prostaglandin E₂, sind nachweislich an der Entstehung des Netzhautödems beteiligt (Guex-Crosier et al., 1999; Miyake et al., 2002). In situ findet sich eine gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale unter Sauerstoffmangel. Eine gesteigerte Freisetzung von ungesättigten Fettsäuren ist zugleich charakteristisch für postischämisches Nervengewebe (Bazan et al., 1970). Oxidativer Stress führt bekanntermaßen zu einer gesteigerten Aktivität der Phospholipase A₂ und Cyclooxygenase (Landino et al., 1996; Lambert et al., 2006). Sauerstoffradikale tragen zu einer Schädigung von neuronalem Gewebe während einer Entzündungsreaktion bei (Balboa et al., 2006). In Gliazellen der Netzhaut von Kontrolltieren wird der intrazelluläre Natriumüberschuss möglicherweise durch einen schnellen Ausstrom von Kalium durch einwärtsgerichtete Kalium-(Kir)-Kanäle kompensiert (Pannicke et al., 2004). Unter diabetischen und ischämischen Bedingungen hat sich gezeigt, dass Kir-Kanäle in Gliazellen der Netzhaut herunterreguliert und/oder inaktiviert werden, was zu einer fehlenden Kompensation des osmotischen Ungleichgewichtes und zu einem Anschwellen der Zellen unter hypotonen Bedingungen führt (Pannicke et al., 2004, 2006). Dennoch bedarf der genaue Mechanismus der Gliazellschwellung unter pathologischen Bedingungen noch detaillierterer Untersuchung in zukünftigen Studien.

5.3 Die Wirkungsweise von Geschlechtshormonen auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen

Die Ergebnisse meiner Arbeit haben gezeigt, dass Sexualhormone eine direkte Schwellungsinhibierende Wirkung auf Gliazellen der Netzhaut haben. Testosteron und Progesteron zeigten ihre Wirkung bereits in nanomolaren Konzentrationen, während sich bei 17 β -Estradiol und Estriol im mikromolaren Bereich eine Wirkung meßbar war. Diese Daten lassen vermuten, dass 17 β -Estradiol und Estriol in mikromolarer Dosierung ihre Wirkung Rezeptor-unabhängig entfalten, während Progesteron und Testosteron spezifische Rezeptoren aktivieren. Eine Rezeptor-unabhängige Wirkungsweise zur Neuroprotektion von Östrogenen ist die Eliminierung freier Radikale und eine damit verbundene Reduktion der Lipidperoxidation. Östrogene agieren als hochwirksame Antioxidantien. Bereits in mikromolarer Konzentration kann 17 β -Estradiol als Antioxidans signifikant oxidative Schäden mindern (Ayres et al., 1998). Der antioxidative Effekt liegt der phenolischen Struktur des Östrogens (Behl et al., 1997) und einer Aufrechterhaltung des reduzierten Status zu Grunde. Dieser Mechanismus ist abhängig von einer permanent ablaufenden NADPH vermittelte zyklische Reaktion (Prokai et al. 2003). Es hat sich gezeigt, dass 17 β -Estradiol hinsichtlich oxidativer Belastung an Gliazellen der Netzhaut einen protektiven Effekt besitzt, was auf eine veränderte Genexpression und Unterdrückung der Apoptose zurück zu führen ist (Li et al., 2006). 17 β -Estradiol konnte nachweislich eine Verlängerung der Lebensfähigkeit von Gliazellen bis hin zur Unterdrückung der Apoptose nach Exposition mit Wasserstoffperoxid bewirken. Mit Hilfe der Ergebnisse einer DNA-Microarray Analyse konnte nach einer 6-stündigen Behandlung mit 17 β -Estradiol eine signifikante Veränderung der Genexpression der Müllerzellen verzeichnet werden (Li et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass 17 β -Estradiol hinsichtlich des Schutzes von Gliazellen der Netzhaut auch einen positiven Kurzzeit-Effekt hat. Dies geschieht vor allem durch Schutz vor oxidativem Stress, welcher zum zytotoxischen Anschwellen der Zellen führen kann.

Testosteron und Progesteron zeigten ihre Wirkung bereits in nanomolaren Konzentrationen. Das lässt vermuten, dass der Effekt von Progesteron und Testosteron durch spezifische Rezeptoren vermittelt wird. Für Gliazellen ist gezeigt, dass sie Rezeptoren für Progesteron exprimieren (Li et al., 1997). Mit Hilfe kultivierter Gliazellen konnte die membranassoziierte Rezeptorkomponente 1 nachgewiesen werden (Swiatek-De Lange et al., 2007). Die membranassoziierte Rezeptorkomponente 1 zeigte sich überwiegend in Müllerzellen und dem Pigmentepithelium der Netzhaut. In diesen Zellen führt Progesteron zu einer

Veränderung der Zellmorphologie, der Kalziumströme und der darauffolgenden Phosphorylierung von Proteinkinase C und der extrazellulären signalregulierten Kinase 1/2 durch Phosphatidylinositol-3 kinase. Gleichzeitig findet eine Expressierung und Sekretion von VEGF durch Aktivierung der Proteinkinase C statt (Swiatek-De Lange et al., 2007). Aus meinen Ergebnissen geht jedoch hervor, dass der schwellungsunterbindende Effekt nicht unmittelbar durch die Aktivierung des VEGF Rezeptors KDR/flk-1 vermittelt wird (Abb. 9A). Damit kann ausgeschlossen werden, dass die von anderen Studien beschriebene Progesteron-induzierte Freisetzung von VEGF am schwellungsinhibierenden Effekt von Progesteron beteiligt ist. Darüber hinaus zeigte sich, dass die schwellungsunterbindende Wirkung von Sexualhormonen von der Aktivierung von verschiedenen Rezeptortypen wie mGluR-, P2Y₁- und dem A₁-Rezeptoren abhängig ist (Abb. 9). Somit kann vermutet werden, dass Sexualhormone, ähnlich wie für VEGF von Wurm et al. (2008) beschrieben, eine Aktivierung der glutaminergen- und purinergen Signalkaskade induzieren (Abb. 12).

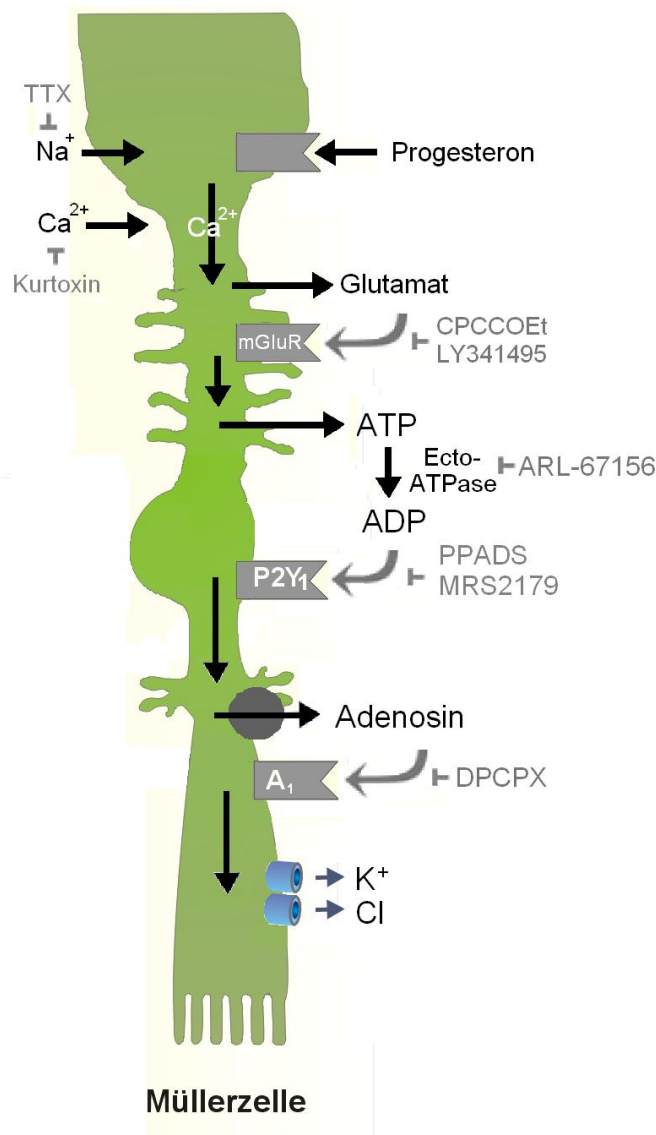


Abbildung 12

Schematische Darstellung der von Progesteron induzierten Mechanismen, die zur Schwellungsinhibition an Müllerzellen beitragen. Die Stimulierung der Progesteronrezeptoren induziert über eine Freisetzung von Glutamat die Aktivierung der metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR). Die Freisetzung von Glutamat wird über spannungsabhängige Na^{+} - und Ca^{2+} -Kanäle gesteuert. Die Aktivierung der mGluRs hat eine nacheinander geschaltete Ausschüttung von ATP und Adenosin zur Folge. Die Ecto-ATPase bewirkt extrazellulär eine Konvertierung von ATP zu ADP, einem Agonisten der P2Y₁-Rezeptoren. Durch die Aktivierung des A₁-Rezeptors mit Hilfe von Adenosin kommt es zur Öffnung von Chlorid- und Kalium-Kanälen in der Gliazellmembran. Der Austausch von Kalium- und Chloridionen führt zu einem Ausgleich des osmotischen Gradienten entlang der Plasmamembran, wodurch ein Anschwellen der Gliazellen unter hypoosmolaren Bedingungen verhindert wird. Die grau unterlegten Hemmstoffe markieren mögliche Angriffspunkte einer Blockade der Progesteron-induzierten Signalkaskade, was unter hypoosmolaren Bedingungen ein Anschwellen der Müllerzelle zur Folge.

5.4 Die intrinsische Aktivität der Signalkaskade

Die Regulierung der Wasser- und Ionenhomöostase der Netzhaut zählt zu den maßgeblichen Aufgaben von Müllerzellen und dem Pigmentepithel (Bringmann et al., 2004). Eine Störung des Gleichgewichts spielt eine entscheidende Rolle für die Entwicklung des chronischen Netzhautödems (Mori et al., 2002). Untersuchungen haben ergeben, dass der Wassertransport in den Gliazellen überwiegend an den Transport von Kalium-Ionen gekoppelt ist (Pannicke et al., 2004). Dabei ist die Existenz von Kir- und Aquaporin-Kanälen für den Transport entscheidend (Nagelhus et al. 1999). Eine verminderte Expression bzw. Funktion dieser Kir- und Aquaporin-Kanäle, wie sie beim Diabetes mellitus oder einer Netzhautischämie (Pannicke et al. 2004; 2006) beschreiben wurde, führt zu einer Störung der Kalium-Clearance und des Wassertransportes in den Gliazellen (Bringmann et al., 2004). Unter veränderten osmotischen Bedingungen hätte insbesondere eine verminderte Kaliumleitfähigkeit ein Anschwellen der Gliazellen zur Folge (Pannicke et al., 2004). Die Aktivierung von Adenosin A₁-Rezeptoren bewirkt die Öffnung von Kanälen für den Austausch von Kaliumionen und Chloridionen (Abb. 12). Das gewährleistet einen schnellen Austausch von Ionen unter hypoosmolarer Belastung (Skatchkov et al. 2006). Ein Öffnen dieser Kanäle mit Hilfe spezifischer Rezeptoren könnte den Austausch von Kalium und Wasser zwischen den Gliazellen und angrenzenden Kompartimenten (z.b. Glaskörper oder Blutgefäße) verbessern. In der Tat scheinen Sexualhormone in der Lage zu sein, den Abtransport von Flüssigkeiten aus ödematösem Netzhautgewebe zu unterstützen. Darüber hinaus sollte die Steroidwirkung, d.h. eine Öffnung zusätzlicher Kaliumkanäle, zu einer Verbesserung der glialen Pufferkapazität führen. Die Möglichkeit des effizienten Kaliumaustausches könnte für das Nervengewebe einen zusätzlichen Schutz vor Übererregbarkeit bieten und einen Beitrag zur Neuroprotektion durch Sexualhormone leisten.

6 Zusammenfassung

Florian Neumann

Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Volumenregulation von Müllerzellen

Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung Pathophysiologie der Neuroglia,
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im August 2012

47 S., 12 Abb., 1 Tab., 74 Lit.

Schlüsselwörter: Progesteron – Volumenhomöostase – Diabetes – Ischämie – Gliazellen

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Geschlechtshormonen auf das Schwellungsverhalten retinaler Gliazellen der Ratte unter hypoosmolaren Bedingungen zu untersuchen. Darüber hinaus war von Interesse, welche Rezeptortypen und intrazellulären Signalwege die Wirkung der Geschlechtshormone vermitteln.

Für die Versuche wurden adulte Long-Evants-Ratten verwendet. Nach Enukleation der Bulbi wurde die Netzhaut isoliert, auf einen Membranfilter verbracht und Netzhautschnitte (1 mm) angefertigt. Zur Darstellung der Müllerzellen im retinalen Gewebe mit Hilfe des Laser Scanning-Mikroskops, wurden die Zellen mit dem Vitalfarbstoff Mitotracker Orange beladen (Uckermann et al., 2004).

Pannicke et al. (2004, 2006) konnten nachweisen, dass Müllerzellen der postischämischen bzw. diabetischen Retina der Ratte unter hypotonen Bedingungen anschwellen, während Kontrollzellen aus der gesunden Retina ihr Volumen konstant halten. Als Ursache für den Verlust einer effizienten Volumenregulation wurde unter anderem eine verminderte

Kaliumleitfähigkeit der Zellen identifiziert (Pannicke et al., 2004; 2006). Um die Fähigkeit zur Volumenregulation zu untersuchen, wurden die akut isolierten retinalen Schnitte einer hypoosmolaren Lösung ausgesetzt (60% der Kontrollosmolarität). Mit Hilfe eines Barium-Modells, in dem es unter hypotonen Bedingungen bei gleichzeitiger Blockade der Kaliumkanäle (K^+ -Kanäle) durch Ba^{2+} zu einer Gliazellschwellung in der Kontrollnetzhaut kommt, konnte eine gestörte Volumenregulation ähnlich, wie für die pathologisch veränderten Retinae beschrieben, simuliert werden (Pannicke et al., 2004).

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde auch in dieser Arbeit das Schwellungsverhalten in der postischämischen bzw. ischämischen Netzhaut untersucht. So konnte ich zeigen, dass Geschlechtshormone die Müllerzellschwellung in hypotonem Milieu der postischämischen sowie diabetisch veränderten Retina nachweislich hemmen, d.h. die Fähigkeit zur effizienten Volumenregulation der Müllerzellen wieder herstellen. Der Großteil der pharmakologischen Untersuchungen des durch die Geschlechtshormone aktivierten Signalweges erfolgte allerdings an gesunden Netzhäuten mit dem zuvor beschriebenen Barium-Modells, um unnötige Tierversuche zu vermeiden.

Geschlechtshormone wie Progesteron und 17β -Estradiol hemmen konzentrationsabhängig das Schwellen der Gliazellen der gesunden Netzhaut in hypoosmolarem Medium in Anwesenheit von Ba^{2+} . Dabei konnte ich beobachten, dass Testosteron und Progesteron im Vergleich zu 17β -Estradiol ihre Wirkung bereits in nanomolarer Konzentration entfalten, was vermuten lässt, dass der Effekt von Progesteron und Testosteron durch spezifische Rezeptoren vermittelt wird. Weiterhin untersuchte ich, ob die schwellungsinhibitorische Wirkung von Progesteron jeweils durch verschiedene Substanzen, welche die purinerge Signalkaskade blockieren, unterdrückt werden konnte. In dieser Substanzgruppe wurden purinerge Rezeptorblocker, wie PPADS, MRS2179 und DPCPX eingesetzt. Alle drei Substanzen bewirkten eine Hemmung von Testosteron und Progesteron. Die Daten lassen vermuten, dass Geschlechtshormone über eine Glutamatfreisetzung und Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren die Freisetzung von purinergen Rezeptoragonisten wie ATP und Adenosin aus Müllerzellen bewirken. Sowohl Tetrodotoxin als auch Kurtosin hatten über die jeweiligen Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle eine hemmende Wirkung auf den volumenregulatorischen Effekt von Progesteron. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Aktivierung von spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanälen der Gliazellen ein essentieller Schritt der Signalkaskade von Progesteron ist.

Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Geschlechtshormone ihre schwellungsunterbindende Wirkung über eine Aktivierung von verschiedenen Rezeptortypen wie mGlu-, $P2Y_1$ - und dem A_1 -Rezeptor vermitteln. Somit kann vermutet werden, dass Sexualhormone, ähnlich wie für VEGF von Wurm et al. (2008) beschrieben, eine Aktivierung

der glutaminergen- und purinergen Signalkaskade induzieren. Weiterhin bleibt zu untersuchen, ob 17β -Estradiol, welches vornehmlich als Antioxidans zu wirken scheint, ebenfalls eine Freisetzung von Rezeptoragonisten in den Gliazellen der Netzhaut induzieren kann. Letztendlich könnten diese Ergebnisse wichtig für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Vermeidung von postischämischen und posttraumatischen Gliazellschwellungen sein.

7 Summary

Florian Neumann

Effect of sex steroids on the volume control of Müller cells

Paul Flechsig Institute of Brain Research, Department of Neurophysiology, Faculty of
Medicine, University of Leipzig

Submitted in August 2012

47 pp., 12 figures, 1 tables, 74 references

Key words: progesterone, volume balance, diabetes, ischemia, glial cells

The aim of the present study was to investigate whether sex steroids inhibit the swelling of glial somata in acutely isolated retinal slices and glial cells of the rat in hypotonic conditions. Furthermore, the special interest was to investigate which receptor subtypes and which intracellular pathways are involved in the effect of sex steroids.

In the laboratory experiment 50 adult Long-Evans-rats were taken. Transient retinal ischemia was induced in one eye of the animal while the other eye remained untreated and served as control. After enucleation of the bulbi, the freshly isolated retinas were placed onto membran filters and cut from these tissues adhering to the membrane filters (thickness, 1mm). The isolated slices were loaded with the vital dye Mitotracker Orange in order to selectively stain Müller glial cells (UCKERMANN et al., 2004). The slices were mounted on the stage of an upright confocal laser scanning microscope.

It has been shown recently that the somata of postischemic and diabetic retinas conformed with the swelling after changing the extracellular perfusate into a hypotonic solution with 60% of the control ionic strength (PANNICKE et al., 2004). A reduced potassium conductance of glial cells in rat retina was identified for the loss of an efficient volume regulation (Pannicke et

al., 2004; 2006). To determine the detailed mechanism of the volume regulation, we simulated the swelling process under hypotonic conditions in the presence of a barium containing solution. As shown recently (Pannicke et. al., 2004), the somata of isolated glial cells displayed similar swelling characteristics as glial cell bodies in retinal slices from control animals when barium ions were coadministered with the hypoosmolar solution. The barium solution provoked an inhibition of the potassium channels in the glial cells.

On the basis of the previous results we investigated the swelling conditions of the somata in postischemic and diabetic retinas. We found that sex steroids inhibited glial swelling in postischemic and diabetic retinas under hypotonic conditions. To obviate animal experiments we ran the majority of the pharmacological examinations in control retinas containing the barium solution to simulate ischemic settings.

The swelling-inhibitory effect of progesterone and 17β -estradiol was dose-dependent. We found that sex steroids rapidly inhibit the osmotic swelling of retinal glial cells. The effects of progesterone and testosterone were apparent at nanomolar concentrations while 17β -estradiol and estriol inhibited swelling at micromolar concentrations. The dose dependence suggests that the effects of progesterone and testosterone might be mediated by specific receptors. We found that the swelling-inhibitory effect of progesterone was prevented by the inhibitor of several subtypes of purinergic receptors, PPADS, the P2Y1-selective antagonist, MRS2179, and the antagonist of adenosine A1 receptors, DPCPX, respectively. The data suggest that sex steroids induce a release of purinergic receptor agonists, likely ATP and adenosine, from retinal glial cells. Furthermore we found that the inhibitor of voltage-dependent sodium, tetrodotoxin and calcium channels, thapsigargin, fully prevented the swelling-inhibitory effect of progesterone in isolated glial cells. These results suggest that the activation of voltage-dependent sodium and calcium channels in glial cells is involved in mediating the swelling inhibition by sex steroids.

However, we found that the swelling-inhibitory effect of sex steroids is dependent on transactivation of mGluRs, P2Y1, and A1 receptors. Thus, it seems to be likely that sex steroids induce an activation of the glutamatergic-purinergic signalling cascade which was described to mediate also the swelling-inhibitory effect of VEGF. Because the effect of 17β -estradiol is likely mediated by its action as antioxidant, it remains to be determined whether such an action may induce a release of receptor agonists from retinal glial cells.

8 Literaturverzeichnis

Adams HA, Baumann G, Cascorbi I, Ebener C, Emmel M, Geiger S, Janssens U, Kli ma U, Klip pe HJ, Knoefel WT, Marx G, Mül ler-Werdan U, Pape HC, Piek J, Prange H, Roes ner D, Roth B, Schürholz T, Standl T, Teske W, Vogt PM, Wer ner GS, Windolf J, Zander R, Zerkowski HR. (2005) Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie der Schockformen der IAG Schock der DIVI. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag

Abbracchio MP, Verderio C. (2006) Pathophysiological roles of P2 receptors in glial cells. Novartis Found Symp 276:91-103; discussion 103-12, 275-81

Ayres S, Abplanalp W, Liu JH. (1998) Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17 β on lipid peroxidation and DNA damage. Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.), 37:1002-1008

Balboa MA, Balsinde J. (2006) Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. Biochim. Biophys. Acta 1761:385-391

Bazan NG jr. (1970) Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. Biochim. Biophys. acta, 218:1-10

Behl C, Skutella T, Lezoualch F. (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens - structure-activity relationship. Mol. Pharmacol. 51:535-541

Bringmann A, Biedermann B, Schnurbusch U, Enzmann V, Faude F, Reichenbach A (2000) Age- and disease-related changes of calcium channel-mediated currents in human Müller glial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:2791–2796

Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P (2004) Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res.* 36:241-249

Bringmann A, Uckermann O, Pannicke T, Iandiev I, Reichenbach A, Wiedemann P. (2005) Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmol Scand.* Oct; 83(5): 528-38.

Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El-Remessy AE, Al-Shabrawey M, Platt DH, Liou GI, Caldwell RW. (2005) Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress. *Curr Drug Targets.* Jun; 6(4): 511-24.

Cascio C, Guarneri R, Russo D, De Leo G, Guarneri M, Piccoli F, Guarneri P (2002) A caspase-3-dependent pathway is predominantly activated by the excitotoxin pregnenolone sulfate and requires early and late cytochrome c release and cell-specific caspase-2 activation in the retinal cell death. *J Neurochem.* Dec;83(6):1358-71.

Chao TI, Skachkov SN, Eberhardt W, Reichenbach A (1994) Na⁺ channels of Müller (glial) cells isolated from retinæ of various mammalian species including man. *Glia.* Mar; 10(3): 173-85.

Compagnone NA, Mellon SH (2000) - Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol.* Jan;21(1):1-56.

Cenedella RJ, Sexton PS, Zhu XL (1999) Lens epithelia contain a high-affinity, membrane steroid hormone-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jun; 40(7):1452-9.

Cunha-Vaz JG, Travassos A (1984) Breakdown of the blood-retinal barriers and cystoid macular edema. *Surv Ophthalmol.* May; 28 Suppl: 485-92.

Dietzel I, Heinemann U, Lux HD (1989) Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia* 2:25-44

Dmitriev AV, Govardovskii VI, Schwahn HN, Steinberg RH (1999) Light-induced changes of extracellular ions and volume in the isolated chick retina-pigment epithelium preparation. *Vis Neurosci* 16:1157–1167

Draca S (2009) Are female sex steroids neuroprotective in experimental stroke. *Med Hypotheses*. Dec; 73(6): 1051-2.

Dubois-Dauphin M, Poitry-Yamate C, de Bilbao F, Julliard AK, Jourdan F, Donati G. (2000) Early postnatal Müller cell death leads to retinal but not optic nerve degeneration in NSE-Hu-Bcl-2 transgenic mice. *Neuroscience* 95(1): 9-21.

Dubal DB, Wilson ME, Wise PM. (1999) Estradiol: a protective and trophic factor in the brain. *J Alzheimers Dis*. Nov;1(4-5):265-74.

Erlend A. Nagelhus, Margaret L. Veruki, Reidun Torp, Finn-M. Haug, Jon H. Laake, Soren Nielsen, Peter Agre, Ole P. Ottersen. (1998) Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *The journal of Neuroscience*, 1. April 1998, 18(7): 2506-2519.

Färber K, Kettenmann H (2005) Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005 Apr;48(2):133-43.

Filosa A, Paixao S, Honsek S, Carmona M, Becker L, Feddersen B, Gaitanos L, Rudhard Y, Schoepfer R, Klopstock T, Kullander K, Rose C, Pasquale E, Klein R. (2009) Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nature Neuroscience* 10.1038/nn.2394, 2009.

Fine BS, Brucker AJ (1981) Macular edema and cystoid macular edema. Am J Ophthalmol. Oct; 92(4):466-81.

Gass JD, Anderson DR, Davis EB. (1985) A clinical, fluorescein angiographic, and electron microscopic correlation of cystoid macular edema. Am J Ophthalmol. Jul 15;100(1):82-6.

Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. (2002) Production and actions of estrogens. N Engl J Med. Jan 31;346(5):340-52.

Guarneri P, Guarneri R, Cascio C, Pavasant P, Piccoli F, Papadopoulos V. (1994) Neurosteroidogenesis in rat retinas. J Neurochem. Jul;63(1):86-96.

Guex-Crosier Y (1999) The pathogenesis and clinical presentation of macular edema in inflammatory diseases. Doc. Ophthalmol. 97:297-309

Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MV, Etgen AM, Zukin RS. (2002) Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. J Neurosci. Mar 15;22(6):2115-24.

Kanksi J. (2004) Klinische Ophtalmologie. Urban & Fischer, 5. Auflage, 134-136.

Kimelberg HK. (1995) Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. J Neurosurg. Dec;83(6):1051-9.

Knepper MA, Verbalis JG, Nielsen S. (1997) Role of aquaporins in water balance disorders. Curr Opin Nephrol Hypertens. Jul;6(4):367-71.

Lambert IH, Pedersen SF, Poulsen KA. (2006) Activation of PLA₂ isoforms by cell swelling and ischaemia/hypoxia. *Acta Physiol. (Oxf.)* 187:75-85

Landino LM, Crews BC, Timmons MD. (1996) Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:15069-15074

Li C, Tang Y, Li F. (2006) 17 β -estradiol (β E₂) protects human retinal Müller cell against oxidative stress in vitro: evaluation of its effects on gene expression by cDNA microarray. *Glia* 53:392-400

Li YC, Hayes S, Young AP. (1997) Steroid hormone receptors activate transcription in glial cells of intact retina but not in primary cultures of retinal glial cells. *J. Mol. Neurosci.* 8:145-158

Liu M, Kelley MH, Herson PS, Hum PD. (2010) Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinol.* 2010 Jun;35(2): 127-43.

Lösel R, Wehling M. (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jan;4(1):46-56.

Masland RH (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci.* Sep;4(9):877-86.

Masland RH (2001) Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol.* Aug;11(4):431-6.

Miyake K, Ibaraki N (2002) Prostaglandins and cystoid macular edema. *Surv. Ophthalmol.* 47:S203-S218

Mori F, Hikichi T, Takahashi J. (2002) Dysfunction of active transport of blood-retinal barrier in patients with clinically significant macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25:1248-1249

Müller H. (1851) Zur Histologie der Netzhaut. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*; 3: 234-7.

Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A. (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26:47-54

Newman EA, Reichenbach A (1996). The Müller cell: a functional element in the retina. *Trends Neurosci*; 19: 307-12.

Newman EA (1989) Potassium conductance block by barium in amphibian Müller cells. *Brain Research*, 498; 308-314 Elsevier

Oshio K, Song Y, Verkman AS, Manley GT. (2003) Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. *Acta Neurochir Suppl.*;86:525-8.

Pannicke T, Iandiev I, Uckermann O. (2004) A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol. Cell. Neurosci.* 26:493-502

Pannicke T, Iandiev I, Wurm A. (2006) Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes* 55:633-639

Papadopoulos MC, Saadoun S, Davies DC, Bell BA. (2001) Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. *Br J Neurosurg. Apr*;15(2):101-8.

Patzelt J. (2005) Basics Augenheilkunde. Verlag: Urban & Fischer bei Elsevier.

Paulson OB, Newman EA. (1987) Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? Science. Aug 21;237(4817):896-8.

Poitry-Yamate CL, Poitry S, Tsacopoulos M. (1995) Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. J Neurosci. Jul;15(7 Pt 2):5179-91.

Prokai L, Prokai-Tatrai K, Perjesi P. (2003) Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100:11741-11746

Puro DG, Mano T. (1991) Modulation of calcium channels in human retinal glial cells by basic fibroblast growth factor: a possible role in retinal pathobiology. J Neurosci. Jun;11(6):1873-80.

Raap M, Biedermann B, Braun P, Milenkovic I, Skatchkov SN, Bringmann A, Reichenbach A. (2002) Diversity of Kir channel subunit mRNA expressed by retinal glial cells of the guinea-pig. Neuroreport. Jun 12;13(8):1037-40.

Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. (1998) Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 29;95(20):11981-6.

Reichenbach A (1999) Neuroglia – Das andere zelluläre Element im Nervensystem: Die Müllersche Gliazelle. 1st ed. Wessobrunn: Socio-medico Verlagsgesellschaft GmbH Medizin + Wissenschaft.

Schnorr B, Kressin M (2006) Embryologie der Haustiere. 6th ed. Stuttgart: Enke.

Skatchkov SN, Eaton MJ, Shuba YM. (2006) Tandem-pore domain potassium channels are functionally expressed in retinal (Müller) glial cells. *Glia* 53:266-276

Silver I.A, Deas J, Erecinska M. (1997) Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience* 78, 589–601.

Sone H, Okuda Y, Kawakami Y, Hanatani M, Suzuki H, Kozawa T, Honmura S, Yamashita K. (1996) Vascular endothelial growth factor level in aqueous humor of diabetic patients with rubeotic glaucoma is markedly elevated. *Diabetes Care*. Nov;19(11):1306-7.

Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, Mervin K, Bowers F, Chu Y, Barnett N, Provis J, Lewis G, Fisher SK, Bisti S, Gargini C, Cervetto L, Merin S, Peer J. (1999) Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 18, 689–735.

Swiatek-De Lange M, Stampfl A, Hauck SM et al (2007) Membrane-initiated effects of progesterone on calcium dependent signaling and activation of VEGF gene expression in retinal glial cells. *Glia* 55:1061-1073

Tomás-Camardiel M, Venero JL, Herrera AJ, De Pablos RM, Pintor-Toro JA, Machado A, Cano J. (2005) Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals. *J Neurosci Res.* Apr 15;80(2):235-46.

Tout S, Chan-Ling T, Holländer H, Stone J. (1993) The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience*. Jul;55(1):291-301.

Tsacopoulos M, Magistretti PJ. (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci.* Feb 1;16(3):877-85.

Uckermann O, Iandiev I, Francke M, Franze K, Grosche J, Wolf S. (2004) Selective staining by vital dyes of Müller glial cells in retinal wholemounts. *Glia* 45:59–66

Uckermann O, Kutzer F, Wolf A, Pannicke T, Reichenbach A, Wiedemann P. (2005) The glucocorticoid triamcinolone acetonide inhibits osmotic swelling of retinal glial cells via stimulation of endogenous adenosine signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 315:1036–1045

Verkman AS, Mitra AK. (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jan;278(1):F13-28.

von Engelhardt W, Breves G. (2005) *Physiologie der Haustiere*. 2nd ed. Stuttgart: Enke.

Wickham LA, Gao J, Toda I, Rocha EM, Ono M, Sullivan DA. (2000) Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol Scand.* Apr;78(2):146-53.

Wurm A, Pannicke T, Wiedemann P. (2008) Glial cell-derived glutamate mediates autocrine cell volume regulation in the retina: activation by VEGF. *J. Neurochem.* 104:386-399

Yanoff M, Fine BS, Brucker AJ, Eagle RC (1984) Pathology of human cystoid macular edema. *Surv Ophthalmol* 28:S505–S511

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als angegebene Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, die in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

24.01.2013

Datum

Florian Neumann

Unterschrift